Über die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure in Mikroorganismen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Karlheinz Altendorf
aus Rimbach

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0128

Über die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure in Mikroorganismen.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Karlheinz Altendorf
aus Rimbach

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 1970
Dekan: Prof. Dr. W. Rüdorff
1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lingens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lingens am Chemischen Institut der Universität Tübingen und am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim angefertigt. Herrn Prof. Dr. F. Lingens danke ich für großzügige Unterstützung und zahlreiche wertvolle Diskussionen sowie die mir bei der Arbeit gewährte Freizügigkeit.

Herrn Dr. A. Bacher danke ich für die Isolierung der Mutante 62-1 AC und Herrn Dipl.-Chem. H. Görisch für Anregungen zu den Enzymversuchen. Herrn Prof. Dr. G. Opitz danke ich für Strukturvorschläge für Substanz A. Herrn Prof. Dr. H. Zähner bin ich für die Gelegenheit zur Benutzung der Fermentationsanlage im Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen zu Dank verpflichtet. Dem Direktor des Chemischen Instituts der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. E. Müller, danke ich für die Ueberlassung eines Arbeitsplatzes.

I n h a l t

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure nach dem bisherigen Stand der Kenntnisse	3
2.1.	Shikimisäure-5-phosphat als Vorläufer der p-Aminobenzoesäure	3
2.2.	Chorismінsäure als Vorläufer von p-Aminobenzoesäure	4
2.3.	Genetische Untersuchungen	6
3.	Ergebnisse und Diskussion	7
3.1.	Untersuchungen an p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Escherichia coli und Candida guilliermondii	7
3.1.1.	Nährstoffbedarf der Mutanten	7
3.1.2.	Kreuzfütterung der Mutanten	8
3.1.3.	Isolierung von fütterungswirksamer Substanz aus dem Akkumulationsmedium von C. guilliermondii C 109	9
3.2.	Isolierung einer Mutante, die mehr Substanz A akkumuliert	12
3.2.1.	Untersuchungen an Aerobacter aerogenes 62-1	12
3.2.2.	Isolierung einer p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante von Aerobacter aerogenes	14
3.2.3.	Genetische Blockierung von A. aerogenes 62-1 AC	14
3.2.4.	Untersuchung der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC	15
3.2.5.	Isolierung von p-Aminobenzoesäure	17
3.2.6.	Isolierung von Substanz A	22
3.2.7.	UV-Spektren von Substanz A	28

Seite

3.3. Untersuchungen an einer Modellsubstanz 31
3.3.1. Isolierung von Chorisminsäure 31
3.3.2. IR-Spektren von Chorisminsäure 31
3.3.3. Massenspektrum von Chorisminsäure 33
3.3.4. Circulardichroismus (CD) und optische Rotationsdispersion (ORD) von Chorisminsäure 35
3.3.5. CD- und ORD-Spektren von Substanz A 37
3.3.6. IR- und Massenspektren von Substanz A 38
3.4. Ueberlegungen zur Struktur von Substanz A 39
3.5. Enzymatische Bildung von Substanz A 46

4. Material und Methoden 49
4.1. Geräte 49
4.2. Reagenzien 49
4.3. Kulturmedien 50
4.4. Stämme 51
4.5. Isolierung der p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante 62-1 AC von A. aerogenes 52
4.6. Kreuzfütterungsversuche 52
4.7. Wachstumstest in flüssigem Medium 53
4.8. Isolierung und Untersuchung von Akkumulaten 53
4.8.1. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für Candida guilliermondii C 109 53
4.8.2. Aufarbeitung der Akkumulatlösung 54
4.8.3. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für A. aerogenes 62-1 55
4.8.4. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für A. aerogenes 62-1 AC 56
4.8.5. Isolierung von p-Aminobenzoesäure aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC 56
4.8.6. Isolierung von Substanz A aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC 57

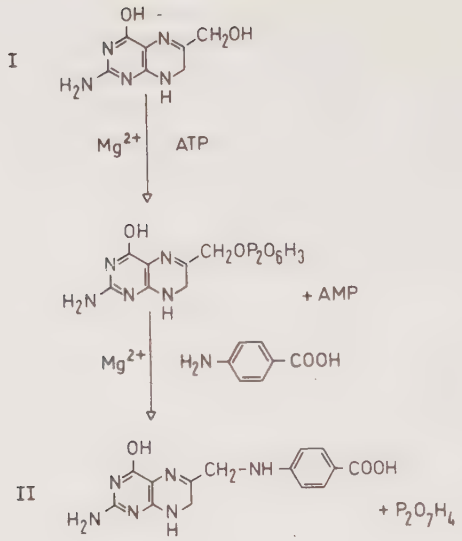
Seite

4.9. Enzymatische Synthese von Substanz A 58
4.9.1. Züchtungsbedingungen für A. aerogenes 62-1 AC 58
4.9.2. Gewinnung von Zellextrakt 59
4.9.3. Enzymansätze 59
4.9.4. Aufarbeitung der Enzymansätze 60
5. Zusammenfassung 61
6. Literaturangaben 63

1. Einleitung

Im Verlauf seiner Untersuchungen über substituierte Benzoesäuren stellte G. Fischer (1) 1863 erstmalig p-Aminobenzoesäure durch Reduktion von p-Nitrobenzoesäure mit Ammoniumhydrogensulfid dar. Erst 1941 gelang Ansbacher (2), bedingt durch Untersuchungen über die bakteriostatische Wirkung des p-Aminobenzolsulfonamids, die Entdeckung des Vitamincharakters der p-Aminobenzoesäure. Zunächst wurde beobachtet, daß die bakteriostatische Wirkung des p-Aminobenzolsulfonamids durch Extrakte aus gewissen Hefefraktionen aufgehoben wird. Woods (3) identifizierte 1940 p-Aminobenzoesäure als den wirksamen Faktor aus Hefe. Kurze Zeit später gelang in verschiedenen Arbeitskreisen (4, 5, 6) die Isolierung von p-Aminobenzoesäure aus Hefe. Gemeinsam mit Fildes (7) stellte Woods die Hypothese auf, daß die bakteriostatische Wirkung des p-Aminobenzolsulfonamids durch die kompetitive Hemmung der Funktion der p-Aminobenzoesäure verursacht wird. Blanchard (6) stellte fest, daß die aus Hefe isolierte p-Aminobenzoesäure nicht in freier Form vorkommt. Ratner und Mitarbeiter (8) bestätigten diese Feststellung und isolierten (9) aus Hefe ein p-Aminobenzoesäure enthaltendes Polypeptid, in dem die p-Aminobenzoesäure durch ihre Carboxylgruppe an eine Peptidkette von zehn bis elf L-Glutaminsäuren gebunden war.

Später zeigte sich, daß p-Aminobenzoesäure ein Baustein der Folsäure ist. Brown und Mitarbeiter (10) konnten bei in vitro Versuchen zeigen, daß 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridin (I) und p-Aminobenzoesäure in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+}-Ionen zu 7,8-Dihydropteroinsäure (II) umgesetzt werden. Diese Reaktion vollzieht sich in zwei Schritten. Damit ist für Escherichia coli gesichert, daß L-Glutamin-



Schema 1. Ausschnitt aus dem Biosyntheseweg der Folsäure

säure erst in einem Folgeschritt mit Dihydropteroinsäure verknüpft wird.

Im Verlauf der Untersuchungen über die Biosynthese aromatischer Aminosäuren gelang es, Einblick in die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure zu erhalten.

2. Die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure nach dem bisherigen Stand der Kenntnisse

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind nur wenige Arbeiten bekannt, die sich mit der Biosynthese der p-Aminobenzoesäure beschäftigten. Bisher war nur eine Tatsache gesichert: Die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure wie auch die Synthesen von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gehen von Chorismsäure aus. Für die Existenz eines Zwischenproduktes zwischen Chorismsäure und p-Aminobenzoesäure gab es nur wenige Hinweise.

2.1. Shikimisäure-5-phosphat als Vorläufer der p-Aminobenzoesäure

Bei der Untersuchung der Biosynthesewege aromatischer Aminosäuren wurden polyauxotrophe Mutanten isoliert, die zum Wachstum auf die gleichzeitige Zufuhr von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoesäure angewiesen waren (11, 12, 13). Dies war ein Hinweis, daß für alle vier Substanzen gemeinsame Vorläufer innerhalb einer Biosynthesekette existieren.

Srinivasan (14) konnte 1959 zeigen, daß Enzymextrakte aus Mutanten von Escherichia coli Shikimisäure-5-phosphat in Anwesenheit von L-Glutamin in Anthranilsäure umwandeln können. Da Anthranilsäure und p-Aminobenzoesäure sich in ihrer Struktur nur bezüglich der Stellung der Aminogruppe innerhalb des Moleküls unterscheiden, nahm Srinivasan an, daß Shikimisäure-5-phosphat auch ein Vorläufer der p-Aminobenzoesäure sei. Eingehende Versuche zeigten, daß Enzymextrakte aus Hefe Shikimisäure-5-phosphat in p-Aminobenzoesäure umwandeln können. Als Stickstoffdonatoren wurden nacheinander L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und Ammoniumchlorid bei verschiedenen p_H-Werten untersucht. Es zeigte sich,

daß nur in Anwesenheit von L-Glutamin p-Aminobenzoesäure gebildet wurde (15). Auch die enzymatische Umsetzung von uniform markiertem ^{14}C-Shikimisäure-5-phosphat bestätigte das obige Ergebnis. Die Menge an gebildeter p-Aminobenzoesäure war allerdings so gering, daß sie nur mit Hilfe von p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten nachgewiesen werden konnte.

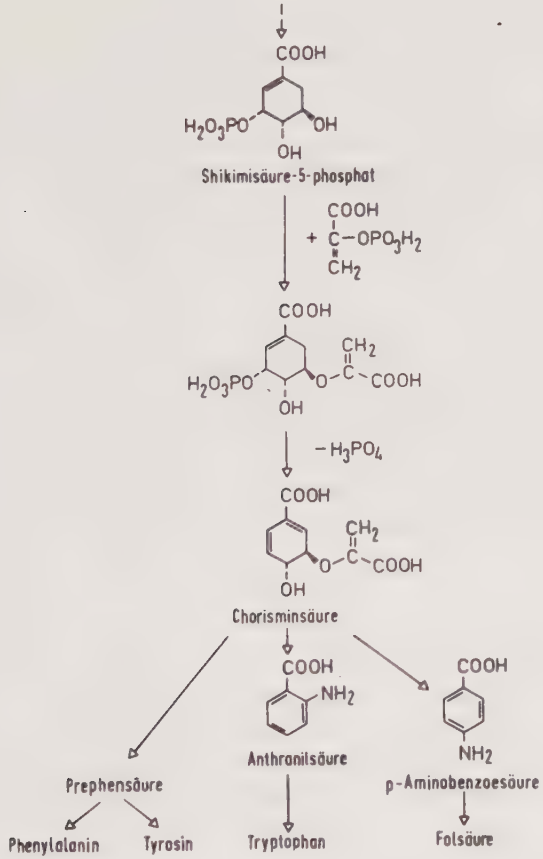
Einige Reaktionen, bei welchen L-Glutamin als Donator einer Aminogruppe beteiligt ist, werden durch ihre Strukturanalogen Aza-4-serin und 6-Diazo-5-oxo-4-norleucin (DON) gehemmt (16, 17). Srinivasan (18) konnte mit Enzymextrakten aus Hefe zeigen, daß auch die Bildung von p-Aminobenzoesäure durch Aza-4-serin und DON gehemmt wird. Dies war eine weitere Bestätigung für die Annahme, daß L-Glutamin bei der Bildung der p-Aminobenzoesäure als Stickstoffdonator fungiert. Versuche mit L-(Amid-^{15}N)glutamin (18) haben ergeben, daß der Amid-Stickstoff des L-Glutamins in p-Aminobenzoesäure eingebaut wird. Da bisher keine Untersuchungen mit L-(Amin-^{15}N)glutamin durchgeführt wurden, kann das obige Ergebnis nur als ein Hinweis betrachtet werden.

2.2. Chorisminsäure als Vorläufer von p-Aminobenzoesäure

Gibson und Mitarbeitern (19, 20, 21, 22) gelang es mit Hilfe der polyauxotrophen Mutante 62-1 von Aerobacter aerogenes, die Chorisminsäure, das Produkt in der Verzweigungsstelle der Biosynthese aromatischer Aminosäuren, zu isolieren. Die Struktur der Chorisminsäure wurde von Jackmann und Mitarbeitern (23, 24) aufgeklärt.

In vitro Untersuchungen (25) mit Enzymextrakten aus Aerobacter aerogenes 62-1 zeigten, daß aus Chorisminsäure in Anwesenheit von L-Glutamin p-Aminobenzoesäure gebildet wird. Damit war gesichert, daß die aromatischen Aminosäuren und p-Aminobenzoesäure bis zur Chorisminsäure einen gemeinsamen

Biosyntheseweg besitzen. In Schema 2 sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt.



Schema 2. Ausschnitt aus der Biosynthesekette aromatischer Aminosäuren.

2.3. Genetische Untersuchungen

Die Umwandlung von Chorisminsäure in Anthranilsäure wird nach den bisherigen Untersuchungen durch ein einziges Enzym katalysiert (26, 27, 28, 29). Zwischenprodukte konnten nicht nachgewiesen werden.

Genetische Untersuchungen an p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Neurospora crassa (30) und Escherichia coli (31) ergaben jeweils zwei nicht benachbarte Gene (pab I und pab II) für die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure. Da die Untersuchungen mit nur wenigen Mutanten durchgeführt wurden, ist es bei einer größeren Anzahl von Mutanten nicht ausgeschlossen, daß noch weitere nicht benachbarte Gene gefunden werden. Sowohl Huang und Pittard (31) als auch Drake (30) konnten bei ihren p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten keine Kreuzfütterung beobachten. Im Gegensatz dazu gelang es Hendler und Srinivasan (32) an zwei p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Neurospora crassa (pab I$^-$ und pab II$^-$), eine Kreuzfütterung nachzuweisen. Die obigen Ergebnisse sprechen für die Existenz einer Zwischenstufe zwischen Chorisminsäure und p-Aminobenzoesäure, über deren Eigenschaften bisher nichts bekannt war.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Isolierung eines Zwischenproduktes der p-Aminobenzoesäurebiosynthese berichtet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten akkumulieren eine Substanz, die das Wachstum anderer p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten fördert. Im folgenden wird sie als Substanz A bezeichnet.

3.1. Untersuchungen an p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Escherichia coli und Candida guilliermondii

Untersuchungen über die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure wurden bisher fast ausschließlich in vitro durchgeführt. Da sich bei der Aufklärung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren die Verwendung von Mangelmutanten bewährt hat, wurde auch in der vorliegenden Arbeit darauf zurückgegriffen.

Die verwendeten p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Escherichia coli und Candida guilliermondii (33) benötigen zum Wachstum 0,001 mg p-Aminobenzoesäure/l. Zwei dieser Mutanten akkumulieren eine Substanz A, die das Wachstum anderer Mutanten fördert. Im folgenden wird über die Untersuchung der Mutanten berichtet.

3.1.1. Nährstoffbedarf der Mutanten

Die Mutanten K 5151, CP 741 und K 430 von E. coli und C 109 von C. guilliermondii wurden mit Hilfe von Blättchentest und Flüssigtest (34) auf ihren Nährstoffbedarf untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Eine Verunreinigung der Folsäure mit p-Aminobenzoesäure verursacht vermutlich die wachstumsfördernde Wirkung dieser Substanz. Die Mutanten K 430 und CP 741 können wahlweise mit

Mutante	Nährstoffbedarf	
K 5151		
CP 741	Methionin oder Tryptophan,	p-Aminobenzoesäure
K 430	Methionin oder Serin oder Cobalamin,	oder Folsäure
C 109		

Tab. 1. Nährstoffbedarf von p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Escherichia coli und Candida guilliermondii.

mehreren Stoffen wachsen, ohne daß stoffliche oder funktionelle Zusammenhänge zwischen diesen Stoffen erkennbar sind. Da Mutante CP 741 mit Tryptophan wachsen kann, wurde sie bei den weiteren Untersuchungen nur in besonderen Fällen angewandt.

3.1.2. Kreuzfütterung der Mutanten

Kreuzfütterungsexperimente haben bei Vitaminmangelmutanten nur in wenigen Fällen eindeutige Resultate ergeben. Die Ergebnisse konnten daher nur Hinweise sein.

Durch Kreuzfütterungsexperimente ließen sich die Mutanten von E. coli K 5151, CP 741 und K 430 in zwei Gruppen aufteilen, wobei Mutante K 430 die Mutanten K 5151 und CP 741 füttert. Das Wachstum der beiden Mutanten ist gering. Im Flüssigtest mit größerer Menge an Akkumulat zeigten die Mutanten K 5151 und CP 741 kräftiges Wachstum. C. guilliermondii C 109 füttert gleichfalls E. coli K 5151 und CP 741. Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge der genetischen Defekte bei den Mutanten:

Mit diesem Ergebnis werden die bisher vorliegenden Hinweise für die Existenz eines Zwischenproduktes bestätigt. Quantitative Austestung der Akkumulatlösung von C. guilliermondii C 109 mit E. coli K 5151 ergab, daß diese Mutante unter geeigneten Bedingungen 0,005 mg Substanz A/l produziert. E. coli K 430 akkumuliert nur 0,001 mg Substanz A/l. Daher wurde C. guilliermondii C 109 für die Anreicherung von Substanz A verwendet.

3.1.3. Isolierung von fütterungswirksamer Substanz aus dem Akkumulationsmedium von C. guilliermondii C 109

C. guilliermondii C 109 akkumuliert in p-Aminobenzoesäurefreiem Medium D eine Substanz, mit der E. coli K 5151 in Medium B wachsen kann. Diese Substanz ließ sich folgendermaßen anreichern: Mutante C 109 wurde in Schüttelkolben mit Medium C angezüchtet, abzentrifugiert, mit Salzlösung gewaschen und in Medium D suspendiert. Nach Inkubation (12 Stunden) wurde das Medium von Zellen befreit, mit NaOH alkalisch gemacht und auf eine Säule aus Dowex 1, Cl^--Form, gegeben. Mit N Ammoniumchlorid-Lösung ließ sich die fütterungswirksame Substanz eluieren, die durch Extraktion mit Essigester weiter angereichert und gereinigt wurde. Chromatographiert man das so erhaltene Rohprodukt an einer Säule aus Sephadex G-10 und eluiert mit deion. Wasser, so beobachtet man nach der Aus-

testung der Fraktionen mit E. coli K 5151 einen großen und zwei kleine Wachstumspeaks (Abb. 1). Letztere wurden bei den

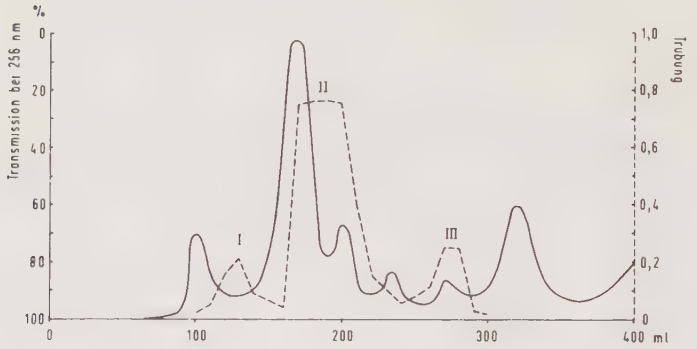


Abb. 1. Chromatographie des Akkumulatgemisches aus C 109 an Sephadex G-10. Säule aus Sephadex G-10, 2,5 x 90 cm, Elution mit deion. Wasser. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K 5151.

weiteren Untersuchungen vernachlässigt. Die quantitative biologische Austestung von Peak (II) zeigte, daß nur minimale Mengen fütterungswirksamer Substanz im Akkumulat enthalten waren. Daher mußten große Mengen an Ausgangsmaterial (insgesamt ca. 500 - 600 l Akkumulatlösung) aufgearbeitet werden.

Zur Gewinnung größerer Mengen an Akkumulatlösung wurde die Mutante C 109 in einem 10-Liter-Fermentor in Medium C angezüchtet und in einen 100-Liter-Fermentor mit 90 l Medium D übergeführt. Nach 20 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium D suspendiert. Nach Inkubation über

Nacht wurden die Zellen abzentrifugiert und das Medium mit NaOH alkalisch gemacht. Anschließend wurde das Medium auf eine Säule aus Dowex 1, Formiat-Form, gegeben. Elution von fütterungswirksamer Substanz erfolgte mit N Ameisensäure. Das Eluat wurde auf eine Säule aus Dowex 50, H^+-Form, aufgetragen, mit deion. Wasser gewaschen und die fütterungswirksame Substanz mit N Ammoniak eluiert. Das Eluat wurde eingeengt, auf eine Säule aus Sephadex G-10 gegeben und mit deion. Wasser eluiert. Die Austestung der Fraktionen mit E. coli K 5151 ergab nur einen Wachstumspeak. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Folgende Untersuchungen zeigten, daß die isolierte Substanz basischen Charakter besitzt: Sie konnte mit verdünnten Säuren nicht von Dowex 50 eluiert werden und wanderte bei der Membranelektrophorese in N Essigsäure zur Kathode.

Bei der weiteren Untersuchung der fütterungswirksamen Substanz mit E. coli K 430 und C. guilliermondii C 109 wurde festgestellt, daß auch diese Mutanten mit der angereicherten Substanz wachsen konnten. Frühere Wachstumsversuche hatten aber gezeigt, daß das native Akkumulat von C. guilliermondii C 109 das Wachstum von E. coli K 430 nicht fördert. Auch eine Selbstfütterung war bei C. guilliermondii C 109 nicht beobachtet worden. Man mußte daher annehmen, daß bei der oben angegebenen Aufarbeitung des Akkumulationsmediums Substanz A in p-Aminobenzoesäure umgewandelt worden ist. Außerdem zeigte die quantitative Austestung der entsprechenden Fraktionen, daß die Mengenverhältnisse (ca. 0,05 mg/200 l Medium) so ungünstig lagen, daß eine weitere Verwendung von C. guilliermondii C 109 für die Anreicherung und Isolierung von Substanz A nicht zweckmäßig war.

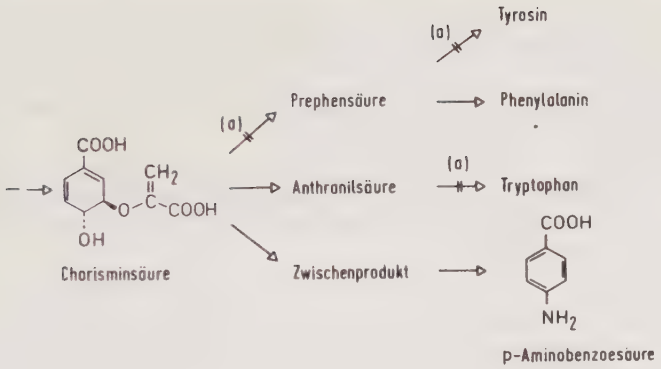
3.2. Isolierung einer Mutante, die mehr Substanz A akkumuliert

Ausgehend von dem oben erwähnten Ergebnis, daß p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten mit 0,001 mg p-Aminobenzoesäure/l wachsen können, kann man bei geeignet blockierten Mutanten mit denselben Mengen an Substanz A im Medium rechnen. Diese grobe Abschätzung gilt nur für Mutanten, die keine weiteren genetischen Defekte nach der Verzweigungsstelle in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren haben.

In vitro Untersuchungen mit Enzymextrakten von A. aerogenes 62-1 hatten gezeigt, daß Chorisminsäure ein Vorprodukt der p-Aminobenzoesäure-Biosynthese ist. Man sollte daher erwarten, daß bei einer Mutante, die große Mengen Chorisminsäure akkumuliert, eine "Kanalisierung" dieser Substanz in Richtung p-Aminobenzoesäure erfolgt. Wenn diese Mutante keinen genetischen Defekt in der Biosynthese der p-Aminobenzoesäure hat, so sollte sie außerdem nachweisbare Mengen an p-Aminobenzoesäure an das Medium abgeben.

3.2.1. Untersuchungen an Aerobacter aerogenes 62-1

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die polyauxotrophe Mutante 62-1 von Aerobacter aerogenes (21, 22), deren genetische Defekte in Schema 3 dargestellt sind. Mutante 62-1 akkumuliert in tryptophanfreiem Medium im UV-Licht intensiv hellblau fluoreszierende Substanzen. Setzt man dem Medium L-Tryptophan zu, um die Anthranilatsynthetase zu hemmen, so treten im Medium nur noch geringe Mengen hellblau fluoreszierender Substanzen auf. Unter diesen Bedingungen werden große Mengen an Chorisminsäure (0,4 g/l) akkumuliert. Im folgenden wurde untersucht, ob und wieviel p-Aminobenzoesäure von der Mutante 62-1 akkumuliert wird.



Schema 3. Genetische Defekte (a) von Aerobacter aerogenes 62-1.

A. aerogenes 62-1 wurde in Schüttelkolben mit Medium G (ohne Guanin) angezüchtet. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Salzlösung gewaschen und in Medium H (ohne Guanin) suspendiert. Nach Inkubation (16 Stunden) wurde das Medium durch Zentrifugieren von Zellen befreit. Die Austestung der Akkumulatlösung erfolgte mit den p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten E. coli K 5151 und C. guilliermondii C 109. Dabei zeigte sich, daß A. aerogenes 62-1 mehr als 0,03 mg p-Aminobenzoesäure/l akkumuliert. Dieses Ergebnis zeigte, daß Mutante 62-1 im Ueberschuß vorhandene Chorismsäure in Richtung p-Aminobenzoesäure kanalisieren

kann. Dadurch war es möglich, durch Einführung eines genetischen Defektes in den Biosyntheseweg der p-Aminobenzoesäure, eine Mutante zu isolieren, die auch größere Mengen Substanz A (ca. 0,05 mg/l) produziert.

3.2.2. Isolierung einer p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante von Aerobacter aerogenes

Als Ausgangsstamm wurde A. aerogenes 62-1 A (35) verwendet, der noch einen zusätzlichen genetischen Defekt im Grundzweig der Purinbiosynthese hat.

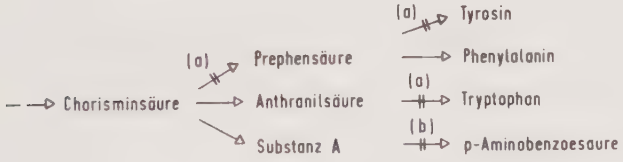
Zellen von A. aerogenes 62-1 A aus der log. Wachstumsphase wurden in Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 6) mit 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin behandelt. Nach Zwischenzüchtung in Medium E wurden die Zellen auf festes Medium E plattiert und nach Inkubation über Nacht auf Medium K und auf Medium L gestempelt. Isolierungen, die nur auf Medium L wuchsen, wurden durch Strichtest und Blättchentest weiter untersucht. Es wurde eine p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante 62-1 AC isoliert, die zum Wachstum in Medium K außer Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Guanin 0,3 mg p-Aminobenzoesäure/l benötigt.

3.2.3. Genetische Blockierung von A. aerogenes 62-1 AC

Wird Mutante 62-1 AC in tryptophanfreien Medien angezüchtet und zur Akkumulation gebracht, so zeigt das von Zellen befreite Medium im UV-Licht eine stark hellblaue Fluoreszenz. Das Medium wurde eingeengt und an einer Säule aus Sephadex G-10 chromatographiert. Mit deion. Wasser konnten große Mengen Anthranilsäure eluiert werden, die UV-spektroskopisch identifiziert wurde. Damit war auf einfache Weise geklärt, daß der neu eingeführte genetische Block bei Mutante 62-1 AC

nicht im Grundzweig der Biosynthesekette aromatischer Aminosäuren, sondern zwischen Chorisminsäure und p-Aminobenzoesäure liegt.

Kreuzfütterungsversuche mit nativem Akkumulat von A. aerogenes 62-1 AC brachten folgendes Ergebnis: E. coli K 5151 wird gefüttert, nicht hingegen E. coli K 430, C. guilliermondii C 109 und A. aerogenes 62-1 AC selbst. Hieraus folgt, daß der neu eingeführte genetische Block bei A. aerogenes 62-1 AC zwischen Substanz A und p-Aminobenzoesäure liegt (Schema 4).



Schema 4. Genetische Defekte (a + b) von Aerobacter aerogenes 62-1 AC in der Biosynthesekette aromatischer Aminosäuren.

3.2.4. Untersuchung der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC

Im Flüssigtest bewirkt die steril filtrierte Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC innerhalb von 14 Stunden volles Wachstum von E. coli K 5151. Allerdings zeigte sich, daß bei längerem Inkubieren bei 37° C (55 - 60 Stunden) auch E. coli K 430 und A. aerogenes 62-1 AC wachsen. Die letztgenannten Mutanten erreichen jedoch ebenfalls innerhalb 20 Stunden volles Wachstum, wenn das steril filtrier-

te Akkumulat 2 Tage bei 37° C vorinkubiert oder 10 Minuten bei 120° C autoklaviert wurde (Abb. 2).

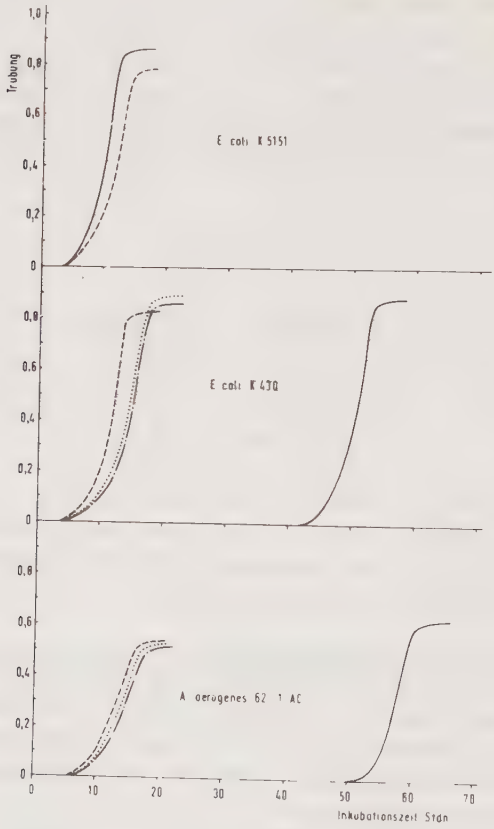


Abb. 2. Wachstum von p-Aminobenzoesäure⁻-Mutanten mit p-Aminobenzoesäure (---), nativem Akkumulat von 62-1 AC (———), Akkumulat 2 Tage bei 37° C vorinkubiert (— · —), Akkumulat nach 10 Min. Erhitzen auf 120° C (...).

C. guilliermondii C 109 zeigt dasselbe Wachstumsverhalten wie E. coli K 430. Hieraus ist zu folgern, daß A. aerogenes 62-1 AC Substanz A akkumuliert, die bei längerer Inkubation bei 37° C oder bei kurzem Erhitzen auf 120° C zumindest teilweise in p-Aminobenzoesäure zerfällt.

Mit der steril filtrierten Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC erreicht E. coli K 5151 noch in einer Verdünnung von 1 : 1000 volles Wachstum. Ein Vergleich mit Akkumulatlösungen von E. coli K 430 und C. guilliermondii C 109 zeigt, daß A. aerogenes 62-1 AC mindestens 50 mal mehr fütterungswirksame Substanz produziert als E. coli K 430 und C. guilliermondii C 109.

3.2.5. Isolierung von p-Aminobenzoesäure

Die Aufarbeitung der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC wurde zunächst nach einem Verfahren von Gibson (36) vorgenommen. Die Austestung der angereicherten Substanz mit E. coli K 5151 und C. guilliermondii C 109 zeigte, daß unter diesen Bedingungen Substanz A in p-Aminobenzoesäure zerfallen war. Zur Isolierung von p-Aminobenzoesäure wurden 20 l Akkumulatlösung folgendermaßen aufgearbeitet: Mutante 62-1 AC wurde in Schüttelkolben mit Medium G angezüchtet, mit Salzlösung gewaschen und in Medium H suspendiert. Nach Inkubation (12 Stunden) wurde das Medium von Zellen befreit, mit HCl auf p_H = 1 gebracht und auf eine Säule aus Dowex 50, H^+-Form, gegeben. Die Säule wurde mit N HCl und mit deion. Wasser gewaschen, und die basischen Substanzen wurden mit N Ammoniak eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeengt, mit Natriumcitratpuffer (p_H = 3,5) aufgenommen und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25 chromatographiert (Abb. 3). Im Test mit E. coli K 5151 waren die Fraktionen 23 - 30 wachstumswirksam.

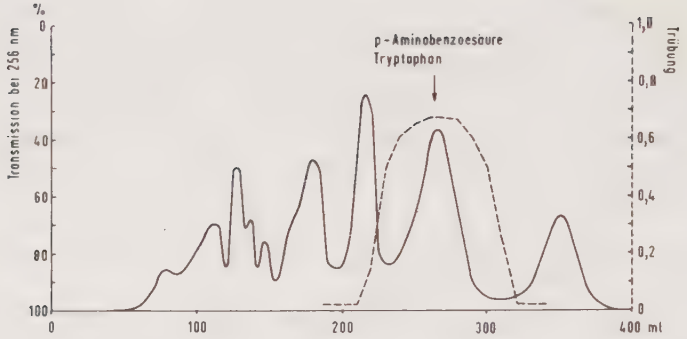


Abb. 3. Chromatographie des Akkumulatgemisches aus 62-1 AC. Säule aus SE-Sephadex C-25, Na^+-Form, 2,5 x 40 cm, Elution mit 0,1 M Natriumcitratpuffer p_H = 3,5. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K 5151.

Die UV-Spektren dieser Fraktionen zeigten allerdings die UV-Maxima von Tryptophan.

Die fütterungswirksamen Fraktionen wurden vereinigt, mit HCl auf p_H = 1 gebracht und an Dowex 50, H^+-Form, wieder von Puffer befreit. Das Eluat wurde eingeengt und an einer Säule aus Sephadex G-10 chromatographiert. Eluiert wurde mit deion. Wasser (Abb. 4).

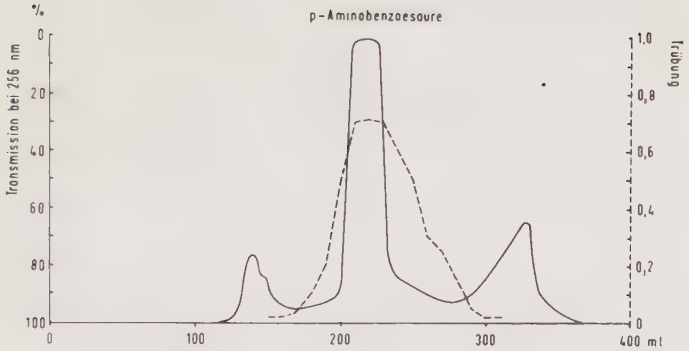


Abb. 4. Chromatographie der fütterungswirksamen Fraktionen von SE-Sephadex an Sephadex G-10. Säule aus Sephadex G-10, 2,5 x 95 cm, Elution mit deion. Wasser. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K 5151.

Tryptophan konnte auf Grund seiner großen Affinität zu Sephadex G-10 mit deion. Wasser nicht eluiert werden. Die Austestung ergab, daß die Fraktionen 19 - 26 wachstumswirksam waren. Diese Fraktionen zeigten bei verschiedenen p_H-Werten dieselben UV-Spektren wie synthetische p-Aminobenzoesäure. Auch bei der Dünnschichtchromatographie zeigten die Substanzen dasselbe Verhalten. Die UV-Maxima und R_f-Werte sind in Tab. 2 und Tab. 3 zusammengestellt.

Substanz	Herkunft	pH	Absorptionsmaxima nm	
p-Aminobenzoesäure	Synthese	7	265	
		3,5	285	224
		1	272	227
	62-1 AC	7	265	
		3,5	285	223
		1	270	227

Tab. 2. UV-Maxima von Aerobacter-aerogenes-Akkumulat und synthetischer p-Aminobenzoesäure.

	R_f-Werte						
p-Aminobenzoesäure	I	II	III	IV	V	VI	VII
62-1 AC	0,74	0,77	0,54	0,42	0,05	0,94	0,59
Synthese	0,72	0,78	0,53	0,42	0,05	0,95	0,60

I	Methanol / n-Butanol / Benzol / Wasser	4 : 2 : 2 : 2	Zellulose MN 300
II	Eisessig / Aceton / Methanol / Benzol	5 : 5 : 20 : 70	
III	iso-Propanol / konz. Ammoniak / Wasser	8 : 1 : 1	
IV	n-Butanol / Äthanol / konz. Ammoniak	40 : 40 : 4 : 8	
V	Benzol / Methanol	95 : 5	
VI	n-Butanol / Eisessig / Wasser	60 : 15 : 25	
VII	n-Butanol / Äthanol / Wasser	50 : 20 : 30	

Tab. 3. R_f-Werte von Aerobacter-aerogenes-Akkumulat und synthetischer p-Aminobenzoesäure.

Auch die Massenspektren beider Substanzen waren identisch (Abb. 5, Schema 5).

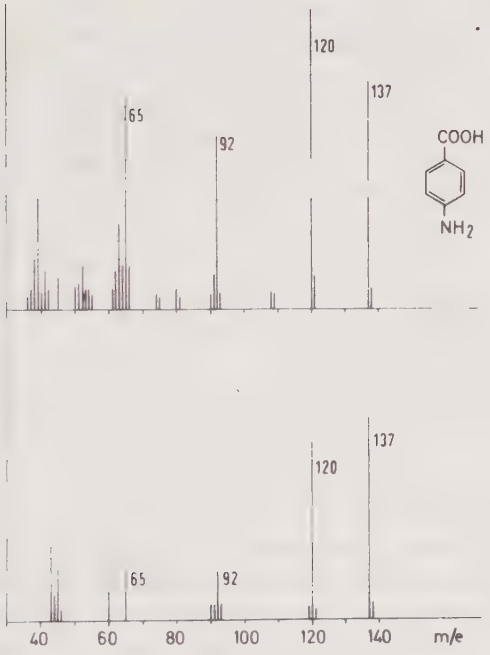
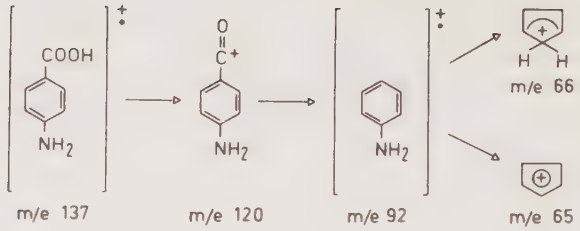


Abb. 5. Massenspektren von p-Aminobenzoesäure (oben) und Substanz aus 62-1 AC (unten). Ionisierungsenergie 70 eV.



Schema 5. Zerfallsreaktionen von p-Aminobenzoesäure im Massenspektrometer.

Aus 20 l Akkumulatlösung wurden ca. 1 - 1,5 mg p-Aminobenzoesäure isoliert.

3.2.6. Isolierung von Substanz A

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß A. aerogenes 62-1 AC eine fütterungswirksame Substanz produziert, die bei der oben beschriebenen Aufarbeitung in p-Aminobenzoesäure zerfällt. Um den Zerfall zu verhindern, wurde die Akkumulatlösung folgendermaßen aufgearbeitet: Das von Zellen befreite Medium wurde auf eine Säule aus Aktivkohle gegeben und mit deion. Wasser gewaschen. Substanz A wurde mit Aethanol/Ammoniak eluiert, die Lösung weitgehend eingeengt und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit deion. Wasser aufgenommen

und an Sephadex G-10 und anschließend an DEAE-Sephadex A-25 (Tris-Puffer, p_H = 8) chromatographiert. Dabei zeigte sich, daß nur mit 0,2 M und nicht mit 0,1 M Tris-Puffer eine Auftrennung der Substanzen an DEAE-Sephadex erfolgte. Weitere Versuche ergaben, daß die Anreicherung und Isolierung von Substanz A mit Hilfe chromatographischer Verfahren ohne Pufferlösungen nicht möglich war. Daher mußte bei dem Wechsel von einem basischen (DEAE-Sephadex) zu einem sauren Ionenaustauscher (SE-Sephadex) Substanz A von Tris-Puffer befreit werden. Eine Entsalzung an Dowex 50 (H^+-Form) konnte wegen Zerfall von Substanz A in saurem Milieu nicht angewandt werden. Eine nochmalige Adsorption an Aktivkohle mußte wegen der dabei auftretenden Substanzverluste vermieden werden. Es wurde daher versucht, die Pufferkomponenten an geeigneten Ionenaustauschern gegen NH_4^+- und OH^--Ionen auszutauschen, da das gebildete Ammoniak im Vakuum leicht entfernt werden konnte. Zunächst gelang es, die basische Komponente des Tris-Puffers an Dowex 50 (NH_4^+-Form) gegen NH_4^+-Ionen auszutauschen. Die ammoniumchloridhaltige Lösung wurde auf eine Säule aus AE-Cellulose (OH^--Form) gegeben und Substanz A mit deion. Wasser und 0,5 N Ammoniak eluiert. Dabei erfolgte ein fast vollständiger Austausch von Cl^-- gegen OH^--Ionen. Anschließend wurden die Fraktionen, die Substanz A enthielten, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und anschließend an SE-Sephadex C-25 (Ammoniumcitratpuffer, p_H = 3,5) chromatographiert. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 6 dargestellt.

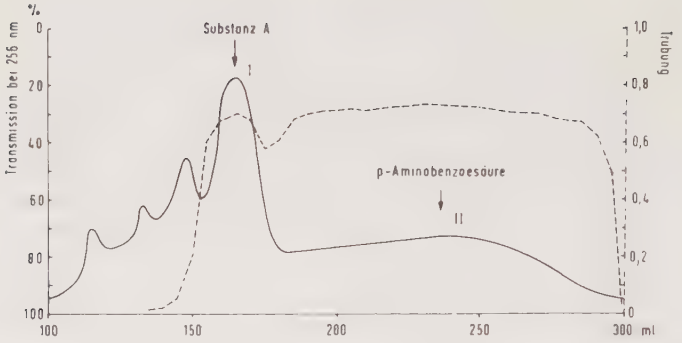


Abb. 6. Chromatographie des Akkumulatgemisches aus 62-1 AC an SE-Sephadex. Säule aus SE-Sephadex C-25, NH_4^+-Form, 2,5 x 40 cm, Elution mit 0,1 M Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5. Austestung der Fraktionen mit E. coli K 5151.

Aus der biologischen Austestung der Fraktionen ging hervor, daß zwei UV-Peaks fütterungswirksam waren. Die UV-Spektren (Tab. 4) zeigten, daß es sich bei (I) um eine bisher unbe-

Substanz	Herkunft	pH	Absorptionsmaxima nm
Substanz A	62-1 AC	7	271
		1	290 221

Tab. 4. UV-Maxima von Substanz A.

kannte Substanz handelte, während (II) p-Aminobenzoesäure war (vgl. Tab. 2). In saurem Milieu (p_H = 1) nahm die Extinktion von (I) bei 290 nm im Lauf von 2-3 Stunden um ca. 90 % ab. Die säurebehandelte Probe zeigte bei p_H = 3,5 und p_H = 8 das charakteristische Absorptionsverhalten von p-Aminobenzoesäure. Damit war nachgewiesen, daß Substanz A in p-Aminobenzoesäure zerfällt. Weitere Versuche zeigten, daß der Zerfall bei p_H = 3,5 und 4° C wesentlich langsamer vor sich geht. Dieses Verhalten wurde für die weitere Reinigung von Substanz A ausgenutzt.

Substanz A wurde mit Ammoniumcitratpuffer auf p_H = 3,5 gebracht und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25, NH_4^+-Form, chromatographiert. Eluiert wurde mit Ammoniumcitratpuffer (Abb.7).

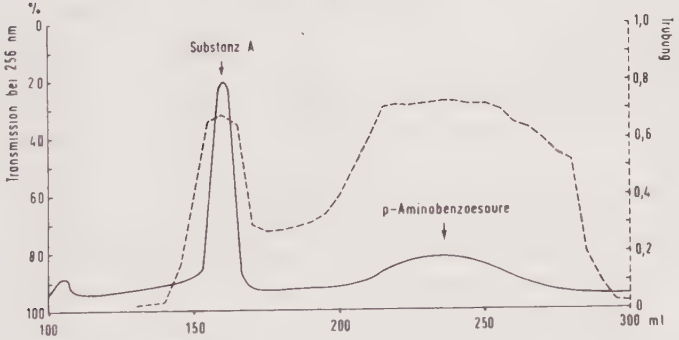


Abb. 7. Chromatographie von Substanz A. Säule aus SE-Sephadex C-25, NH_4^+-Form, 2,5 x 40 cm, Elution mit 0,1 M Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K5151.

Die Austestung der Fraktionen mit E. coli K 5151 ergab, daß nur geringe Mengen an p-Aminobenzoesäure entstanden waren. Die Verschmierung von biologischer Aktivität zwischen den beiden großen Wachstumspeaks deutet darauf hin, daß während der Chromatographie immer etwas Substanz A zerfallen ist. Fraktionen mit Substanz A wurden vereinigt, mit HCl auf p_H = 1 gebracht und 6 Stunden bei diesem p_H - Wert stehen gelassen. Nochmalige Chromatographie dieser Probe an SE-Sephadex C-25 unter den obigen Bedingungen ergab nur noch einen UV-aktiven Peak, dessen Fraktionen auch fütterungswirksam waren (Abb. 8). Die UV-Spektren der entsprechenden Frak-

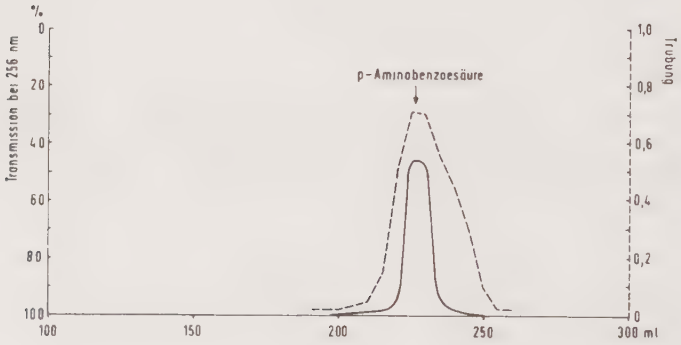


Abb. 8. Chromatographie des Zerfallsproduktes von Substanz A. Säule aus SE-Sephadex C-25, 2,5 x 40 cm, NH_4^+-Form, Elution mit Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K 5151.

tionen zeigten bei verschiedenen p_H-Werten das charakteristische Absorptionsverhalten von p-Aminobenzoesäure. Weitere UV-aktive Verbindungen wurden bei dem Zerfall von Substanz A in p-Aminobenzoesäure nicht gefunden.

Da Substanz A in der Akkumulatlösung nur in minimalen Mengen (0,05 mg/l) enthalten ist und bei der Aufarbeitung ein teilweiser Zerfall in p-Aminobenzoesäure nicht verhindert werden kann, mußten große Mengen an Ausgangsmaterial aufgearbeitet werden (insgesamt ca. 300 l). Durch die Züchtung in Schüttelkulturen war die Menge an Akkumulatlösung auf 60 l pro Ansatz beschränkt.

Zur Gewinnung von Akkumulatlösung wurde Mutante 62-1 AC in 2-Liter-Schüttelkolben mit Medium G angezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Salzlösung gewaschen und in Medium H suspendiert. Nach Inkubation (12 Stunden) wurden die Zellen durch Zentrifugieren entfernt und das Medium wie oben beschrieben aufgearbeitet. Substanz A von der Säule aus SE-Sephadex C-25 wurde an Dowex 50 und an AE-Cellulose von Puffer befreit. Weitere Verunreinigungen, insbesondere die durch Zerfall von Substanz A entstandene p-Aminobenzoesäure, konnten durch Chromatographie an ECTEOLA-Cellulose (OH^--Form) entfernt werden (Abb. 9).

Die Aufarbeitung der Akkumulatlösung wurde durch den Zerfall von Substanz A in saurem Milieu sehr erschwert. Die angewandten basischen Chromatographieverfahren brachten keine gute Auftrennung und waren zum Teil mit erheblichen Substanzverlusten verbunden. Der Reinigungsschritt an SE-Sephadex C-25 konnte nicht umgangen werden, da mit Trennverfahren im basischen Milieu keine vollständige Abtrennung von Verunreinigungen möglich ist. Ein teilweiser Zerfall von Substanz A in p-Aminobenzoesäure konnte auch bei 4° C (p_H = 3,5) nicht vermieden wer-

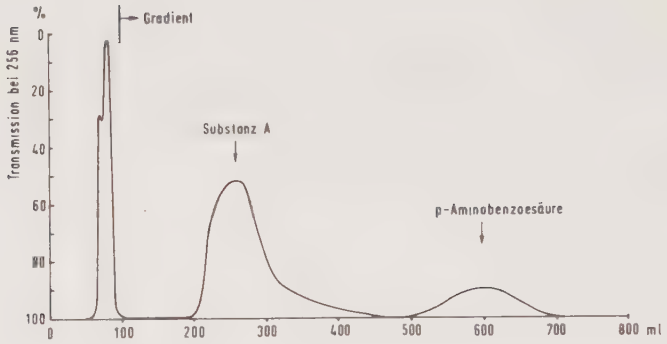


Abb. 9. Chromatographie von Substanz A. Säule aus ECTEOLA-Cellulose, 2,5 x 30 cm, OH^--Form, Elution mit deion. Wasser und Ammoniakgradient (0 - 0,5 N).

den. Geht man von der Menge an p-Aminobenzoesäure aus, die aus der Akkumulatlösung von Mutante 62-1 AC unter bestimmten Bedingungen isoliert werden kann, so waren 15 mg an Substanz A/ 300 l Akkumulatlösung zu erwarten. Bisher ließen sich nur 0,5 - 0,7 mg an Substanz A/ 300 l isolieren.

3.2.7. UV-Spektren von Substanz A

In neutraler und alkalischer Lösung hat Substanz A ein

UV-Maximum bei 271 nm und eine Schulter bei 214 nm. Bei p_H = 3,5 oder p_H = 1 tritt eine bathochrome Verschiebung des Maximums nach 290 nm auf, und ein weiteres Maximum mit kleinerem Extinktionskoeffizienten erscheint bei 221 nm (Abb. 10).

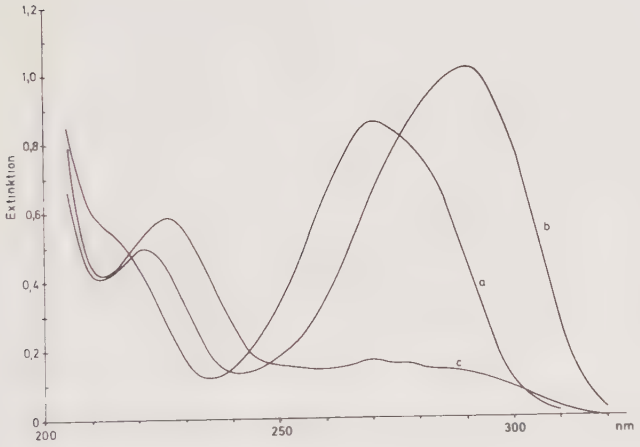


Abb. 10. UV-Spektren von Substanz A; a) p_H = 7, b) p_H = 1, c) nach 6 Stunden bei p_H = 1.

Bringt man eine Lösung von Substanz A mit Ammoniumcitratpuffer auf p_H = 3,5, läßt 30 Min. stehen und gibt anschließend 0,1 N NaOH zu, bis p_H = 8 erreicht ist, so zeigt sich, daß die

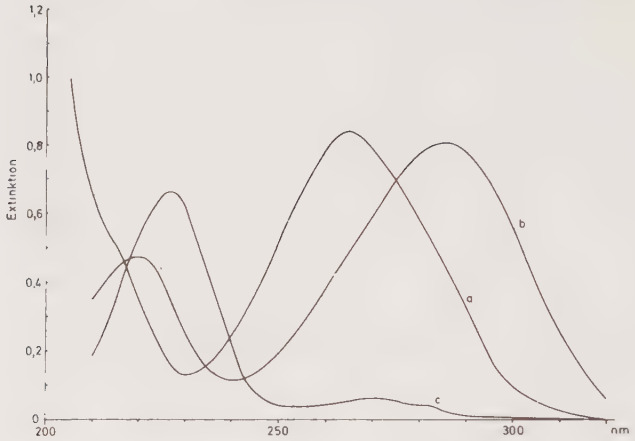


Abb. 11. UV-Spektren von p-Aminobenzoesäure; a) p_H = 7, b) p_H = 3,5, c) p_H = 1.

bathochrome Verschiebung reversibel ist. Läßt man eine wäßrige Lösung von Substanz A bei p_H = 1 2 - 3 Stunden stehen, so nimmt die Extinktion bei 290 nm um ca. 90% ab. Das Maximum bei 221 nm wird unter Extinktionserhöhung nach 226 nm verschoben.

Aus den Extinktionsverhältnissen von Substanz A und p-Aminobenzoesäure, die durch Zerfall aus Substanz A entstanden

ist, kann man abschätzen, daß der Extinktionskoeffizient von Substanz A größer als der von p-Aminobenzoesäure ist. Die UV-Spektren beider Substanzen sind in Abb. 10 und Abb. 11 bei verschiedenen p_H -Werten gegenübergestellt.

3.3. Untersuchungen an einer Modellsubstanz

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß Substanz A unter bestimmten Bedingungen in p-Aminobenzoesäure zerfällt. Auf Grund dieses Verhaltens konnte man vermuten, daß die Aufnahme von IR- und Massenspektren von Substanz A Schwierigkeiten bereiten würde. Daher schien es geeignet, entsprechende Vorversuche an einer Modellsubstanz vorzunehmen. Für diesen Zweck war Chorisminsäure aus mehreren Gründen geeignet: Diese Substanz läßt sich in ausreichenden Mengen aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 auf einfache Weise isolieren; Chorisminsäure ist ebenfalls eine Verbindung, die unter bestimmten Bedingungen in mehrere Produkte zerfällt (37); außerdem ist Chorisminsäure ein Vorprodukt in der Biosynthese von p-Aminobenzoesäure.

3.3.1. Isolierung von Chorisminsäure

Aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 wurde Chorisminsäure nach der Methode von Gibson (36) isoliert. Das stark gelbgefärbte Rohprodukt wurde in Aether gelöst, mit Aktivkohle geschüttelt und anschließend abfiltriert. Aus der farblosen Aetherlösung wurde die Chorisminsäure mit Petroläther gefällt und aus Essigester/Petroläther noch zweimal umkristallisiert.

3.3.2. IR-Spektren von Chorisminsäure

Bei der Aufnahme der IR-Spektren von Chorisminsäure ergab

sich, daß eine Substanzprobe, die 12 Stunden über P_2O_5/KOH bei 4° C im Vakuum getrocknet worden war, keine gute Auflösung der einzelnen Bereiche zeigte (Abb. 12 a). Wurde Chorisminsäure aber 4 Tage über P_2O_5/KOH bei 4° C im Vakuum getrocknet, so erhielt man ein IR-Spektrum mit sehr guter Auflösung der einzelnen Bereiche, die für diese Substanz noch nicht erreicht wurde (Abb. 12 b). Man kann vermuten, daß durch den längeren Trocknungsprozeß locker gebundenes Wasser entfernt und dadurch die Auflösung verbessert wurde. Folgende Absorptionen sind für Chorisminsäure charakteristisch: 3300 - 3200 (OH), 1720 - 1690 (-COOH) und 1620 (C = C) cm^{-1}. Plieninger und Mitarbeiter konnten zeigen (38), daß Absorptionen bei 1740 und 1620 cm^{-1} für Enoläther der Brenztraubensäure charakteristisch sind. Das Auftreten von Absorption bei 860 cm^{-1} wird möglicherweise durch die out-of-plane Deformationsschwingung der Methylengruppe des Enoläthers verursacht (24).

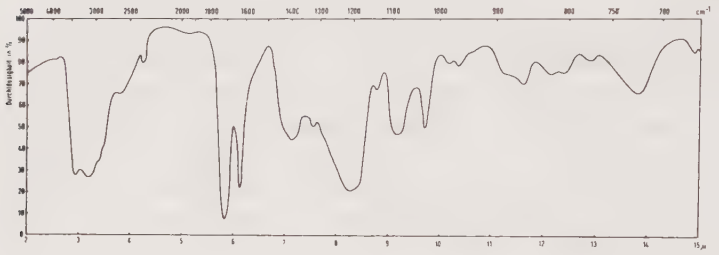


Abb. 12 a. IR-Spektrum von Chorisminsäure; Substanzprobe 12 Stunden getrocknet.

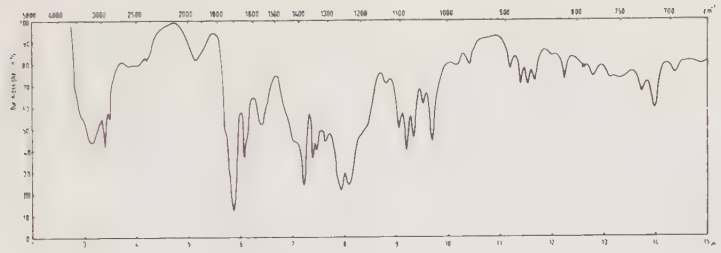


Abb. 12 b. IR-Spektrum von Chorisminsäure; Substanzprobe 4 Tage getrocknet.

3.3.3. Massenspektrum von Chorisminsäure

Das Massenspektrum von Chorisminsäure (I) weist keinen Molekülpeak auf (Abb. 13). Ein schwacher Peak bei m/e = 208 entspricht der Bildung von (II) durch Abspaltung von H_2O aus Chorisminsäure (I) (Schema 6). Ein Peak bei m/e = 164 macht die Bildung von Phenylbrenztraubensäure (III) wahrscheinlich, die durch Umlagerung von Chorisminsäure bei gleichzeitigem Verlust von CO_2 und H_2O entstehen kann. Weitere CO_2- und H_2O-Abspaltung aus (III) führt über das Fragment m/e = 118 zum Tropylium - Kation m/e = 91. Ein Peak bei m/e = 138 entspricht der Bildung von p-Hydroxybenzoesäure.

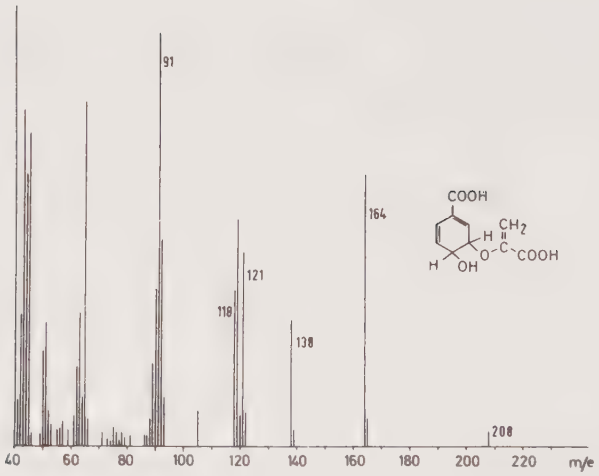
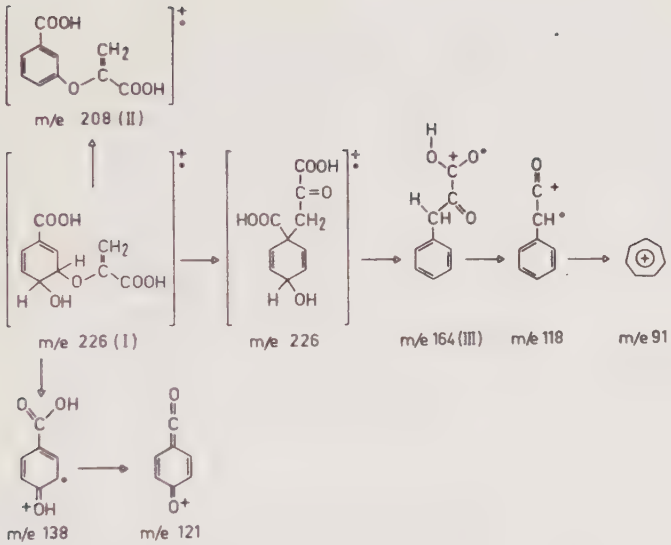


Abb. 13. Massenspektrum von Chorisminsäure. Ionisierungsenergie 70 eV.



Schema 6. Zerfallsreaktionen von Chorisminsäure im Massenspektrometer.

3.3.4. Circulardichroismus (CD) und optische Rotationsdispersion (ORD) von Chorisminsäure

Das ORD-Spektrum von Chorisminsäure in wäßriger Lösung zeigt

einen negativen Cotton-Effekt bei 34,5 . 10^3 cm^{-1} (Abb. 14).

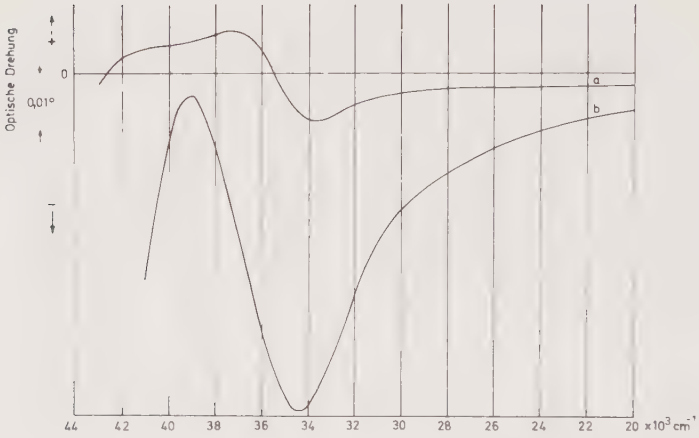


Abb. 14. Optische Rotationsspektren von Substanz A (a) und Chorisminsäure (b) in wäßriger Lösung.

Ein Nulldurchgang tritt nicht auf.

Das CD-Spektrum von Chorisminsäure in wäßriger Lösung zeigt zwei negative Cotton-Effekte bei 37,4 . 10^3 und 45 . 10^3 cm^{-1} (Abb. 15), wobei kein positiver Uebergang beobachtet wird.

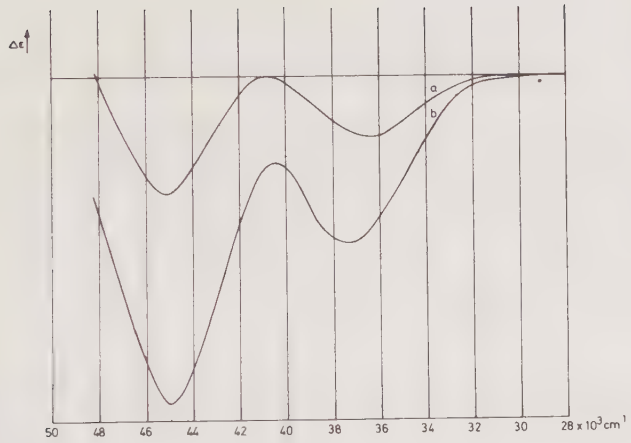


Abb. 15. Circulardichroismus von Substanz A (a) und Chorisminsäure (b) in wäßriger Lösung.

3.3.5. CD- und ORD-Spektren von Substanz A

Bei CD-Messungen an Substanz A in wäßriger Lösung traten zwei negative Cotton-Effekte bei $36{,}3 \cdot 10^3$ und $45{,}2 \cdot 10^3$ cm^{-1} auf (Abb. 15). Zwischen diesen beiden konnte ein positiver Uebergang nicht ausgeschlossen werden, da bisher noch nicht genügend Substanz zur Verfügung stand.
Das ORD-Spektrum von Substanz A in wäßriger Lösung zeigt bei

$33{,}5 \cdot 10^3$ cm^{-1} einen negativen Cotton-Effekt, der bei $35{,}7 \cdot 10^3$ cm^{-1} seinen Nulldurchgang hat (Abb. 14).

Die Aufnahme der CD- und ORD-Spektren wurde in den meisten Fällen durch die Fluoreszenz von p-Aminobenzoesäure (Anregungsmaximum: 290 nm; Emissionsmaximum: 345 nm) gestört, die durch Zerfall von Substanz A in minimalen Mengen vorhanden war.

Ein Vergleich mit den CD- und ORD-Spektren von Chorisminsäure läßt vermuten, daß Substanz A im Molekül ein asymmetrisch substituiertes C-Atom trägt. Ein quantitativer Vergleich zwischen beiden Substanzen ist allerdings nicht möglich, da der Extinktionskoeffizient von Substanz A noch unbekannt ist.

3.3.6. IR- und Massenspektren von Substanz A

Die Voraussetzungen für die Aufnahme von IR- und Massenspektren von Substanz A waren allerdings weniger günstig als bei Chorisminsäure, da nur ungefähr 0,5 mg an Substanz A zur Verfügung stand. Bei der Aufnahme von IR-Spektren von Substanz A wurde festgestellt, daß diese Substanz hygroskopisch ist. Das IR-Spektrum zeigte zwei Gruppen von Banden mit stark unterschiedlicher Intensität (Abb. 16). Diejenigen Bereiche, die Auskunft über funktionelle Gruppen im Molekül geben, waren schlecht aufgelöst, so daß es nicht möglich war, Hinweise für Substituenten am Molekül zu erhalten.

Die Hygroskopizität von Substanz A wirkte sich besonders nachteilig für die Aufnahme von Massenspektren aus. Beim Durchfahren des Temperaturbereiches von 50° - 350° C und einer Anregungsenergie von 70 eV konnten keine charakteristischen Fragmente gefunden werden. Die Substanz war im Einlaßsystem verkohlt.

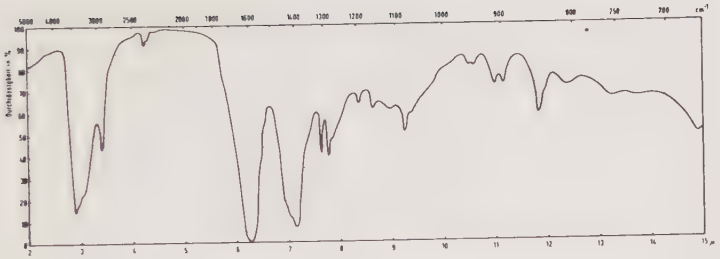
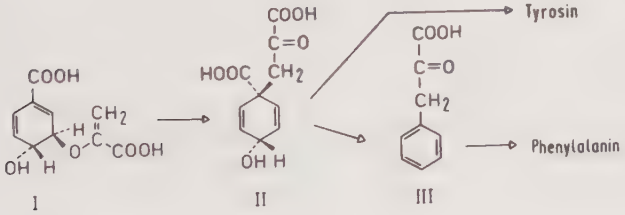


Abb. 16. IR-Spektrum von Substanz A.

3.4. Ueberlegungen zur Struktur von Substanz A

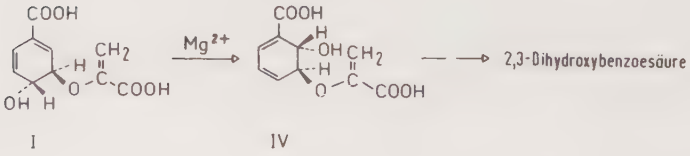
Bei der Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin tritt Prephensäure (II) als gemeinsamer Vorläufer auf (39, 40, 41).



Die Umwandlung von (II) in Phenylbrenztraubensäure (III) erfolgt in schwach saurem Milieu auch ohne Enzym. Dadurch wird verständlich, daß eine Mutante, die zwischen (II) und (III) genetisch blockiert ist, leaky-Phänomen zeigt. Man kann den Zerfall von (II) unterbinden, indem man das Absinken des p_H auf Werte < 7 verhindert. Bei A. aerogenes 62-1 AC konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden. Eine mit Salzlösung gewaschene Zellsuspension von Mutante 62-1 AC wurde auf Minimalagar K ausgestrichen und bei 37° C bebrütet. Nach ca. 50 Stunden trat Wachstum auf, das durch Zerfall von Substanz A zu p-Aminobenzoesäure verursacht wurde. Untersuchungen an isolierter Substanz A haben gezeigt, daß der Zerfall in Abhängigkeit der H^+-Ionenkonzentration mehr oder weniger schnell verläuft.

Aus der Labilität und dem damit verbundenen leichten Uebergang in p-Aminobenzoesäure kann man für die Struktur von Substanz A folgern, daß es sich um einen 6-Ring handelt, der in 1-Stellung des Moleküls eine Carboxylgruppe und in 4-Stellung eine Aminogruppe trägt. Außerdem muß man annehmen, daß der Struktur von Substanz A kein aromatisches System zugrunde liegt.

Gibson und Mitarbeiter (42, 43) konnten Isochorismінsäure (IV) als Zwischenprodukt der Biosynthese von 2,3-Dihydroxybenzoesäure nachweisen und isolieren. Diese Substanz hat ein UV-Maximum bei 278 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von



I IV

ca. 13000. Ein Vergleich mit Chorisminsäure (I) (275 nm, ε = 2630) zeigt, daß durch die Konjugation der Carboxylgruppe mit dem Dien-System des 6-Rings der Extinktionskoeffizient größer wird.

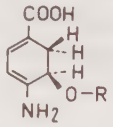
Eine weitere Bestätigung für diese Interpretation sind die Angaben über 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (V) (44). Diese Substanz wird von Streptomyces-aureofaciens-Mutanten

V

akkumuliert, die wenig oder kein Tetracyclin mehr produzieren können. Aber auch Tetracyclin produzierende Stämme, die in einem Medium kultiviert werden, in dem Antibiotikabildung verhindert wird, akkumulieren Substanz (V). Das UV-Spektrum von Substanz (V) hat ein Maximum bei 278 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 9350.

Vergleicht man die Extinktion einer bestimmten Menge an Substanz A mit der Extinktion der durch Protonenkatalyse daraus entstehenden p-Aminobenzoesäure, so stellt man fest, daß der Extinktionswert der gebildeten p-Aminobenzoesäure geringer ist als der von Substanz A. Man kann deshalb annehmen, daß der Extinktionskoeffizient von Substanz A größer ist als der von p-Aminobenzoesäure. Geht man von dem Konjugationssystem der Isochorisminsäure (IV) aus, und erweitert es durch Substitution einer Aminogruppe in 4-Stellung des Rings, so

kommt man zu Extinktionskoeffizienten, die über 15000 liegen. Auf Grund der bisherigen Ueberlegungen kann man für Substanz A folgenden Strukturvorschlag (VI) machen:



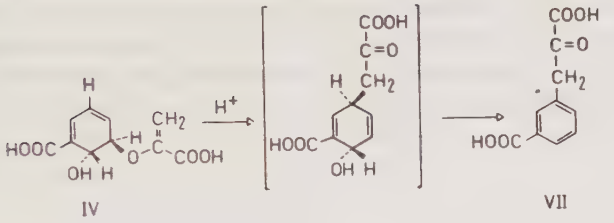
VI

Im Vergleich zur Chorisminsäure (I) sprechen die ORD- und CD-Spektren von Substanz A für die Erhaltung des optisch aktiven Zentrums in 3-Stellung des 6-Rings.

Auffallend bei Verbindung (V) ist die Stabilität in saurem Milieu. In konzentrierter HCl ist nach 1 Stunde bei 60° C erst die Hälfte in Anthranilsäure zerfallen. Die Autoren schließen daraus auf eine trans-Stellung von Amino- und Hydroxylgruppe.

Im Gegensatz dazu steht die Instabilität von Isochorisminsäure (IV). Obwohl auch hier eine trans-Stellung der Substituenten in 2- und 3-Stellung vorliegt, tritt schon mit N HCl (100° C, 10 Min.) ein vollständiger Zerfall ein. Da bei Substanz (IV) unter diesen Bedingungen kaum eine trans-Eliminierung von Brenztraubensäure möglich ist, weicht das Molekül dem vorhandenen Elektronenzug durch eine Umlagerung aus. In einer Art Claisen-Umlagerung, die nicht nach 1-Stellung wie bei Chorisminsäure, sondern nach 5-Stellung geht, entsteht 3-Carboxyphenylbrenztraubensäure (VII). Salicyl-

säure und m-Hydroxybenzoesäure entstehen in sehr geringen Mengen.



IV VII

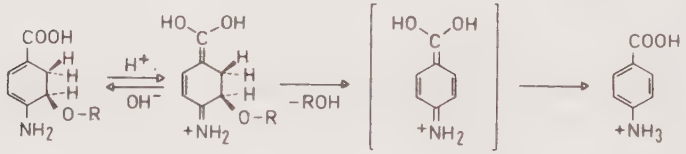
Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem Strukturvorschlag (VI) für Substanz A, so wird klar, daß in saurem Milieu durch eine trans-Eliminierung von R-OH p-Aminobenzoesäure entsteht. Aus Mangel an Substanz konnte bisher noch nicht geklärt werden, ob Substanz (VI) in 3-Stellung des Rings einen Enol-Brenztraubensäureäther oder eine Hydroxylgruppe trägt.

Auch in stark alkalischer Lösung zeigt sich die Stabilität von Substanz (V). Erst nach 8-stündigem Erhitzen in siedendem Wasserbad (25 % NaOH) tritt der Zerfall in m-Hydroxybenzoesäure ein. Demgegenüber zerfällt Isochorismінsäure schon nach 10 Min. bei 100° C (N NaOH) in 3-Carboxyphenylbrenztraubensäure (70 %) und Salicylsäure (20 %).

Erhitzt man Substanz A 10 Min. in N NaOH in siedendem Wasserbad, so stellt man anschließend keine Veränderungen der UV-Spektren fest. Auch die Fütterungswirksamkeit für E. coli K 5151 blieb erhalten. Diese Ergebnisse sind eine weitere Stütze für Strukturvorschlag (VI).

Während Isochorismінsäure (IV) und 2,3-Dihydro-3-hydroxy-

anthranilsäure (V) keine p_H-abhängigen UV-Spektren zeigen, tritt bei Substanz A beim Uebergang vom neutralen zum sauren Milieu im UV eine bathochrome Verschiebung von 20 nm auf. Aus dieser protonierten Verbindung erfolgt dann der Zerfall in p-Aminobenzoesäure. Da die bathochrome Verschiebung im alkalischen Milieu reversibel ist, kann man für den protonierten Zustand von Substanz A folgende Struktur (VIII) postulieren:

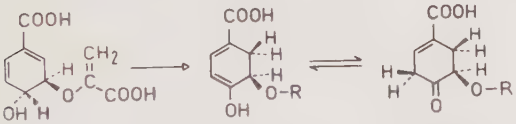


VI VIII

Verbindung (VIII) kann unter Eliminierung von R-OH in p-Aminobenzoesäure zerfallen.

Ueber den Mechanismus der Bildung von Anthranilsäure und p-Aminobenzoesäure aus Chorisminsäure in Anwesenheit von L-Glutamin ist bisher nichts bekannt. Die Umsetzung zur Anthranilsäure wird noch dadurch kompliziert, daß unter bestimmten Voraussetzungen auch Ammoniumionen als Stickstoffdonator (45) fungieren können und nur ein Enzym die Umsetzung katalysiert. Durch die Isolierung von Substanz A (VI) ist es gelungen, ein stickstoffhaltiges Vorprodukt in der Biosynthese von p-Aminobenzoesäure nachzuweisen. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, über einen möglichen Mechanismus dieser Reaktion zu diskutieren. Vergleicht man die Bildung von Substanz A (VI) mit Reaktionen, bei denen ebenfalls L-Glutamin

als Stickstoffdonator fungiert (46, 47), so tritt nur dann eine Umsetzung ein, wenn eine enolische oder acide Hydroxylgruppe vorliegt. Bei Chorismінsäure (I) erfüllt die Hydroxylgruppe in 4-Stellung diese Voraussetzung nicht. Man muß daher eine enzymatisch katalysierte Isomerisierung annehmen, um zu einer Hydroxylgruppe mit einer Keto-Enol-Tautomerie zu kommen.



I IX

Die Umsetzung von Substanz (IX) mit dem Amid-Stickstoff des L-Glutamins führt dann zu einem Enamin (X), wobei in

X VI

diesem Fall das Gleichgewicht fast vollständig auf der Seite von (VI) liegt. Man muß annehmen, daß die Amid-Stickstoff-Kohlenstoffbindung nach der Reaktion sofort hydrolysiert und L-Glutaminsäure frei wird, da man bisher bei den Endprodukten keine Substitution am Stickstoff nachweisen konnte. Die Annahme, daß die Synthese der p-Aminobenzoesäure über Isochorismінsäure verlaufen soll, läßt sich mit den bisher

bekannten Reaktionen, bei denen L-Glutamin als Stickstoffdonator beteiligt ist, nicht in Einklang bringen. Man könnte eher vermuten, daß Isochorisminsäure als Zwischenstufe bei der Biosynthese der Anthranilsäure durchlaufen wird.

3.5. Enzymatische Bildung von Substanz A

A. aerogenes 62-1 AC wurde in Medium G angezüchtet, abzentrifugiert, mit Salzlösung gewaschen und in Medium H suspendiert. Nach Inkubation (2 - 3 Stunden) wurden die Zellen abzentrifugiert und bei -20° C eingefroren.

Die Zellen wurden mit Aluminiumoxid aufgeschlossen, der Zellbrei mit kaltem 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8 aufgenommen und anschließend bei 20 000 g zentrifugiert. Der klare Zellextrakt wurde zur Ausfällung von Nucleinsäuren mit Dehydrostreptomycinsulfatlösung versetzt. Nach Zentrifugation wurde der klare Ueberstand fraktioniert mit Ammoniumsulfat (0 - 30 %; 30 % - 50 %; 50 % - 70 % Sättigung) gefällt. Die einzelnen Proteinfällungen wurden in 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8 aufgenommen.

Die Enzymansätze enthielten: Proteinlösung, Chorisminsäure, L-Glutamin und $MgCl_2$. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde nochmals L-Glutamin zugegeben und weitere 30 Min. bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aceton gestoppt und das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt und anschließend biologisch ausgetestet. Dabei zeigte sich, daß die Ansätze mit 30 % - 50 % Ammoniumsulfatsättigung fütterungswirksam waren. Weiterhin ließ sich zeigen, daß nur E. coli K 5151, nicht hingegen E. coli K 430 und C. guilliermondii C 109 damit wachsen konnten. Hiermit war gesichert, daß Substanz A enzymatisch aus Chorisminsäure gebildet wurde.

Bei einem größeren Enzymansatz wurde das Protein nach der Inkubation durch Aceton ausgefällt, die Lösung auf ein

kleines Volumen eingeengt und auf eine Säule aus Sephadex G-25 gegeben. Die Elution erfolgte mit Tris-Puffer p_H = 8. Die fütterungswirksamen Fraktionen wurden an Dowex 50 (NH_4^+-Form) und an AE-Cellulose (OH^--Form) weitgehend von Puffer befreit und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25 chromatographiert. Eluiert wurde mit Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5 (Abb. 17). Die biologische Austestung der einzelnen Fraktionen

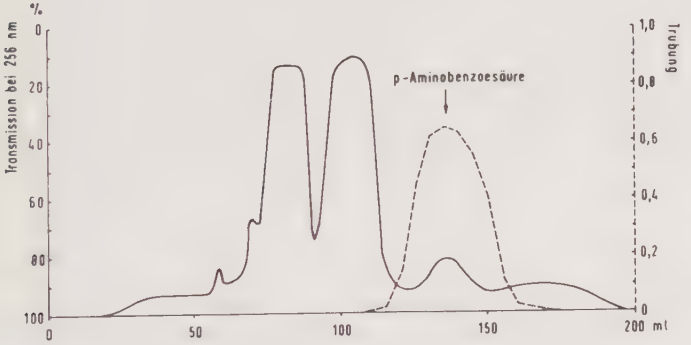


Abb. 17. Chromatographie des Enzymansatzes. Säule aus SE-Sephadex C-25, 2,5 x 15 cm, NH_4^+-Form, Elution mit 0,1 M Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5. Austestung der Fraktionen erfolgte mit E. coli K 5151.

ergab einen wachstumsaktiven Peak. Die Untersuchung der entsprechenden Fraktionen zeigte jedoch, daß nicht nur das Wachstum von E. coli K 5151, sondern auch von E. coli K 430

und C. guilliermondii C 109 gefördert wurde. Substanz A war vollständig in p-Aminobenzoesäure zerfallen. Die UV-Spektren der entsprechenden Fraktionen bei verschiedenen p_H -Werten bestätigten das Ergebnis der biologischen Austestung. Die enzymatischen Untersuchungen sprechen dafür, daß Substanz A ein Zwischenprodukt in der Biosynthese von p-Aminobenzoesäure ist.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte

Zur Messung von UV-Spektren wurde das Gerät DMR 21 von Zeiss, Oberkochen, benutzt. IR-Spektren wurden mit dem Spektrographen von Leitz, Wetzlar, unter Benutzung der Mikroeinrichtung 6 : 1 in KBr gemessen. Zur Aufnahme der Massenspektren diente das doppelfokussierende Spektrometer MS 9 von AEI. Optische Rotationsspektren wurden mit dem Spektralpolarimeter REPM 12 von Zeiss, Oberkochen, aufgenommen. Zur Messung des Circulardichroismus wurde ein Dichrograph II von Roussel Jouan benutzt. Die Auswertung der Wachstumsversuche erfolgte durch Trübungsmessung mit dem Photometer Eppendorf und dem Biophotometer Jouan. Lyophilisiert wurde mit der Gefriertrocknungsanlage L 2 von WKF, Brandau.

4.2. Reagenzien

Folgende Produkte wurden benutzt: DL-Tryptophan, L-Tryptophan und p-Aminobenzoesäure von Merck A.G., Guanin von Böhringer, Mannheim, L-Glutamin von Ajinomoto. Chorisminsäure wurde aus dem Kulturmedium von Aerobacter aerogenes 62-1 isoliert (36).

Adsorbentien für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie: Zellulose MN 300 von Macherey Nagel Co., Düren, Aktivkohle 0,3 - 0,7 mm von Merck AG, Dowex 1 Wx8, Dowex 50 Wx8, AE-Cellulose und ECTEOLA-Cellulose von Serva, Heidelberg, Sephadex G-10, DEAE-Sephadex A-25 und SE-Sephadex C-25 von Pharmacia.

4.3. Kulturmedien

a) Kulturmedien für Escherichia coli

Medium A: 8 g Nutrient Broth (Difco), 5 g NaCl, 1 l deion. Wasser.

Medium B: 3,5 g K_2HPO_4, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g Na-Citrat . 5 1/2 H_2O, 0,1 g $MgSO_4$. 7 H_2O, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g Glukose, 1 l deion. Wasser.

b) Kulturmedien für Candida guilliermondii

Medium C: 10 g Yeast Extract (Difco), 10 g Bacto Pepton (Difco), 20 g Saccharose, 1 l deion. Wasser.

Medium D: 0,875 g K_2HPO_4, 0,125 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$. 7 H_2O, 0,1 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$. 2 H_2O, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 10 g Saccharose, 10 ml der nachstehenden Spurenlösung, 1 l deion. Wasser.

Spurenlösung: 50 mg H_3BO_3, 4 mg $CuSO_4$. 4 H_2O, 10 mg KJ, 20 mg $FeCl_3$. 6 H_2O, 40 mg $MnSO_4$. 4 H_2O, 20 mg $(NH_4)_2MoO_4$, 1 mg Biotin, 1 l deion. Wasser.

c) Kulturmedien für Aerobacter aerogenes

Medium E: 10 g Bacto Pepton (Difco), 10 g Yeast Extract (Difco), 20 g Glukose, 1 l deion. Wasser.

Medium F: 10 g Bacto Trypton (Difco), 5 g Yeast Extract (Difco), 2 g Glukose, 20 mg Guanin, 0,05 mg p-Aminobenzoesäure, 1 l deion. Wasser.

Medium G: 2 g Yeast Extract (Difco), 2 g Casamino Acids (Difco), 3,6 g Glukose, 41 mg DL-Tryptophan, 20 mg Guanin, 20 ml der nachstehenden Mineralsalzlösung, 1 l deion. Wasser. Glukose wurde separat autoklaviert.

Mineralsalzlösung: 10 g $MgSO_4$. 7 H_2O, 100 g Citronensäure . H_2O, 500 g K_2HPO_4, 175 g $NaNH_4HPO_4$. 4 H_2O, 670 ml deion.

Wasser.

Medium H: 32,6 g $NaHPO_4$. 12 H_2O, 1,36 g KH_2PO_4, 18 g Glukose, 2,7 g NH_4Cl, 10 mg $MgCl_2$. 6 H_2O, 2 mg L-Tryptophan, 2 mg Guanin, 1 l deion. Wasser. Das Medium wurde nicht autoklaviert.

Medium K: Medium B + 20 mg L-Tyrosin, 20 mg L-Tryptophan, 20 mg L-Phenylalanin und 20 mg Guanin.

Medium L: Medium K + 0,05 mg p-Aminobenzoesäure.

Salzlösung: 5 g NaCl, 0,12 $MgSO_4$. 7 H_2O, 1 l deion. Wasser.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Medien bei 120° C 20 Min. autoklaviert. Für feste Nährböden wurde den Medien 2,1 % Agar (Difco) zugesetzt.

4.4. Stämme

p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten K 5151, K 430 und CP 741 von Escherichia coli wurden auf Schrägröhrchen mit Medium A gehalten und im Abstand von drei Monaten überimpft.

p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante C 109 wurde durch Behandlung von Candida guilliermondii (Stamm Burkholder) CBS 2021 mit Methansulfonsäureäthylester erzeugt (33) und alle drei Monate auf frisches Medium C überimpft.

Mutante 62-1 AC von A. aerogenes wurde durch Behandlung einer polyauxotrophen Mutante 62-1 A (35) mit 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin erzeugt. Der Nährstoffbedarf der untersuchten Mutanten geht aus Tabelle 5 hervor:

Mutante	Nährstoffbedarf	
62-1		Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan
62-1A	Guanin oder Hypoxanthin,	
62-1AC	Guanin oder Hypoxanthin, p-Aminobenzoesäure,	

Tab. 5. Nährstoffbedarf von Aerobacter-aerogenes-Mutanten.

Die Mutanten wurden bei 4° C auf Schrägröhrchen mit Medium F gehalten und alle vier Wochen überimpft.

4.5. Isolierung der p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante 62-1 AC von A. aerogenes

Die Mutationsversuche wurden gemeinsam mit A. Bacher durchgeführt.

Die Mutante 62-1 A wurde über Nacht bei 37° C unter Schütteln in 10 ml Medium E angezüchtet. 0,3 ml der Uebernachtkultur wurden in 10 ml frisches Medium E überimpft und weitere 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. 1 ml der Zellsuspension wurde zentrifugiert, die Zellen wurden zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer (p_H = 6) unter Zusatz von Magnesiumsulfat (0,12 g/l) und 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (0,1 g/l) bei 37° C unter Schütteln eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 10 ml Salzlösung suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde mit 10 ml Medium E versetzt und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen nach geeigneter Verdünnung auf Medium E plattiert und über Nacht bei 37° C bebrütet. Die Bakterienkolonien wurden dann mit Hilfe von sterilem Samt auf Medium K und L gestempelt. p-Aminobenzoesäure-bedürftige Kolonien wurden durch Strichtest und Blättchentest (34) weiter überprüft. Dabei wurde eine Mutante 62-1 AC erhalten.

4.6. Kreuzfütterungsversuche

Mutanten von E. coli bzw. A. aerogenes wurden über Nacht in 5 ml Medium A bzw. E angezüchtet, zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 5 ml Salzlösung suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde in sterilen Petrischalen mit 15 ml handwarmem Minimalagar B bzw. K vermischt. Danach wurde mit der

Platinöse eine dicke Zellsuspension von jeder Mutante auf jede Minimalagarplatte aufgetragen und bei 37° C bebrütet. Wenn eine im Minimalagar suspendierte Mutante wächst, so bedeutet das, daß sie ihren genetischen Block vor der akkumulierenden Mutante hat. Durch Variation der Versuchsanordnung lassen sich auch Mutanten verschiedener Organismenarten gegeneinander testen (34).

4.7. Wachstumstest in flüssigem Medium

Mutanten von E. coli bzw. A. aerogenes wurden über Nacht in 5 ml Medium A bzw. E angezüchtet, zweimal mit Salzlösung gewaschen und in 50 ml Salzlösung suspendiert. Röhrchen mit 5 ml Medium B bzw. L wurden mit 0,1 ml Akkumulatlösung bzw. $5 \cdot 10^{-6}$ mg p-Aminobenzoesäure versetzt, mit einem Tropfen der Zellsuspension beimpft und bei 37° C bebrütet.

C. guilliermondii C 109 wurde in Medium C angezüchtet. Die Inkubation erfolgte in Medium D bei 30° C. Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung im Biophotometer Jouan und im Photometer Eppendorf bestimmt.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden zum biologischen Nachweis von Substanz A E.coli K 5151 und von p-Aminobenzoesäure C. guilliermondii C 109 verwandt.

4.8. Isolierung und Untersuchung von Akkumulaten

4.8.1. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für Candida guilliermondii C 109

a) Versuche im Labormaßstab: Schüttelkolben mit 0,5 l Medium C wurden mit Hefezellen angeimpft und unter Schütteln (150 rpm) bei 30° C 2 Tage inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und zur

Akkumulation in demselben Volumen unsterilem Medium D suspendiert. Nach Inkubation (12 Stunden) unter Schütteln bei 30° C wurden die Zellen abzentrifugiert.

b) Versuche im 100-Liter-Maßstab: Mutante C 109 wurde in 2 Schüttelkolben mit je 0,5 l Medium C geimpft und 2 Tage unter Schütteln bei 30° C inkubiert. Die Kultur wurde in einem New-Brunswick-Labor-Fermentor mit 10 l Medium C übergeführt und 20 Stunden unter Belüftung (4 l Luft/Min.) bei 30° C mit 150 rpm gerührt. Die Zellsuspension wurde dann in einen Fermentor (New Brunswick Fermacell) mit 90 l Medium D überführt und unter den obigen Bedingungen weitere 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia) abzentrifugiert und in 100 l frischem, insterilem Medium D 12 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert.

4.8.2. Aufarbeitung der Akkumulatlösung

a) Aufarbeitung im Labormaßstab: 2 l von Zellen befreites Akkumulationsmedium wurde mit 10 N NaOH auf p_H = 12 gebracht. Durch vorherige Zugabe von stöchiometrischen Mengen an AEDTA (Aethylendiamintetraessigsäure) wurde das Ausfallen von $Mg(OH)_2$ verhindert. Die alkalische Lösung wurde auf eine Säule aus Dowex 1 Wx8 (Cl^--Form, 2,5 x 10 cm, deion. Wasser) gegeben. Die Elution der fütterungswirksamen Substanz erfolgte mit N Ammoniumchloridlösung. Das Eluat wurde mit 4 N HCl auf p_H = 1 gebracht und mit Essigester mehrmals extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, einmal mit deion. Wasser gewaschen und 12 Stunden über $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit wenig deion. Wasser aufgenommen und an einer Säule aus Sephadex G-10 (2,5 x 90 cm, deion. Wasser) chroma-

tographiert. Eluiert wurde mit deion. Wasser. Nach biologischer Austestung der Fraktionen zeigten sich drei Wachstumspeaks.

b) Aufarbeitung von 200 l Akkumulatlösung: 200 l zellfreies Akkumulationsmedium wurde wie oben beschrieben mit stöchiometrischen Mengen AEDTA versetzt und mit 10 N NaOH alkalisch gemacht. Anschließend wurde die Lösung auf eine Säule aus Dowex 1 Wx8 (Formiat-Form, 12 x 70 cm, deion. Wasser) gegeben, mit deion. Wasser gewaschen und die fütterungswirksame Substanz mit N Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8, H^+-Form, 8 x 20 cm, deion. Wasser) gegeben, mit deion. Wasser gewaschen und mit N Ammoniak eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeengt, mit deion. Wasser aufgenommen und an einer Säule aus Sephadex G-10 (2,5 x 100 cm, deion. Wasser) chromatographiert. Die biologische Austestung ergab einen Wachstumspeak. Wachstumstests zeigten, daß minimale Mengen an p-Aminobenzoesäure isoliert worden waren.

4.8.3. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für A. aerogenes 62-1

Die Mutante 62-1 wurde in Schüttelkolben mit 0,5 l Medium G (ohne Guanin) geimpft und unter Schütteln (150 rpm) bei 37° C solange inkubiert, bis die Extinktion der Zellsuspension bei 620 nm (1 cm Quarzküvetten) den Wert 1,3 erreichte. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und zur Akkumulation in demselben Volumen Medium H (ohne Guanin) suspendiert. Nach Inkubation unter Schütteln bei 30° C (16 Stunden) wurden die Zellen abzentrifugiert. Im zellfreien Medium wurde die p-Aminobenzoesäure biologisch bestimmt.

4.8.4. Züchtungs- und Akkumulationsbedingungen für A. aerogenes 62-1 AC

Mutante 62-1 AC wurde in Flaschen mit 0,5 l Medium G geimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert. 100 ml der Vorkultur wurden in 2-Liter-Schüttelkolben mit 0,9 l Medium G überführt und unter Schütteln (150 rpm) bei 30° C solange inkubiert, bis die Extinktion der Zellsuspension bei 620 nm (1 cm Quarzküvetten) den Wert 1,3 erreichte. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen, in demselben Volumen Medium H suspendiert und 12 Stunden bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurde das Akkumulationsmedium durch Zentrifugieren von Zellen befreit.

4.8.5. Isolierung von p-Aminobenzoesäure aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC

20 l zellfreie Akkumulatlösung wurden mit 4 N HCl auf p_H = 1 gebracht und auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (H^+-Form, 5 x 30 cm, deion. Wasser) gegeben. Die Säule wurde zur Entfernung von Salzen mit 1 l N HCl und anschließend mit deion. Wasser gewaschen. Dann wurde mit N Ammoniak eluiert. Die Fraktionen, die UV-aktive Substanzen enthielten, wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit 0,1 M Natriumcitratpuffer (p_H = 3,5) aufgenommen und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25 (2,5 x 40 cm, Na^+-Form im Gleichgewicht mit 0,1 M Natriumcitratpuffer p_H = 3,5) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von 10 ml aufgefangen. Nach 230 ml Eluat erschien ein UV-Peak, der im Wachstumstest biologisch aktiv war und dessen UV-Spektren das charakteristische Absorptionsverhalten von Tryptophan zeigten. Die Fraktionen 23 - 30 wurden vereinigt und wie oben beschrieben an Dowex 50 Wx8 (H^+-Form, 1,5 x 20 cm) von Puffer befreit. Fraktionen, die UV-aktive Substanzen enthielten, wurden vereinigt, im Vakuum

zur Trockne eingeengt, mit deion. Wasser aufgenommen und an einer Säule aus Sephadex G-10 (2,5 x 95 cm, deion. Wasser) chromatographiert. Nach 200 ml Eluat erschien ein UV-aktiver Peak, der im Wachstumstest Aktivität zeigte. Die Maxima der UV-Spektren dieser Fraktionen waren bei verschiedenen p_H-Werten mit denen von synthetischer p-Aminobenzoesäure identisch. Aus 20 l Akkumulatlösung konnten 1 - 1,5 mg p-Aminobenzoesäure isoliert werden.

4.8.6. Isolierung von Substanz A aus der Akkumulatlösung von A. aerogenes 62-1 AC

60 l zellfreie Akkumulatlösung wurde über eine Säule aus gekörnter Aktivkohle (5 x 60 cm) gegeben. Substanz A wurde an der Kohlesäule adsorbiert. Die Säule wurde mit deion. Wasser gewaschen und mit Aethanol/2 N Ammoniak (1 : 3, v/v) solange eluiert, bis das Eluat keine Fütterungswirksamkeit mehr zeigte. Das Eluat wurde im Vakuum bei 25°C eingeengt und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit deion. Wasser aufgenommen und an einer Säule aus Sephadex G-10 (4,8 x 100 cm, deion. Wasser) chromatographiert. Eluiert wurde mit deion. Wasser. Die fütterungswirksamen Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum eingeengt und danach lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit 0,2 M Tris-Puffer (p_H = 8) aufgenommen, auf eine Säule aus DEAE-Sephadex A-25 (5 x 40 cm, Cl^--Form im Gleichgewicht mit 0,2 M Tris-Puffer p_H = 8) gegeben und mit demselben Puffer eluiert. Zwischen 1 l und 2,5 l Eluat erschien Substanz A. Die entsprechenden Fraktionen wurden im Vakuum eingeengt und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde in deion. Wasser aufgenommen, auf eine Säule aus Sephadex G-10 (5 x 100 cm, 0,01 M Tris-Puffer p_H = 8) gegeben und mit 0,01 M Tris-Puffer p_H = 8 eluiert. Substanz A erschien in der Front. Die entsprechenden

Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und auf eine Säule aus Dowex 50 Wx8 (NH_4^+-Form, 5 x 30 cm, deion. Wasser) gegeben. Eluiert wurde mit deion. Wasser. Bei dieser Chromatographie wurde die basische Komponente des Tris-Puffers gegen NH_4^+-Ionen ausgetauscht. Die fütterungswirksamen Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und auf eine Säule aus AE-Cellulose (OH^--Form, 5 x 20 cm, deion. Wasser) gegeben. Dadurch wurde ein weitgehender Austausch der Cl-Ionen gegen OH^--Ionen erreicht. Nach Eluierung von Substanz A mit deion. Wasser und 0,5 N Ammoniak wurden die entsprechenden Fraktionen im Vakuum eingeengt. Die Lösung wurde mit 0,1 M Ammoniumcitratpuffer auf p_H = 3,5 gebracht und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25 (2,5 x 40 cm, NH_4^+-Form im Gleichgewicht mit 0,1 M Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5) chromatographiert. Eluiert wurde mit demselben Puffer. Nach 150 ml Eluat erschien Substanz A. Zur Abtrennung von gebildeter p-Aminobenzoesäure und weiterer Verunreinigungen wurden die entsprechenden Fraktionen wie oben beschrieben an AE-Cellulose von Puffer befreit. Das eingeengte Eluat wurde auf eine Säule aus ECTEOLA-Cellulose (OH^--Form, 2,5 x 30 cm, deion. Wasser) gegeben. Mit deion. Wasser wurden UV-aktive Verunreinigungen eluiert. Anschliessend wurde die Säule mit einem Ammoniakgradienten (0 - 0,5 N) eluiert. Nach 200 ml Eluat erschien Substanz A, nach 540 ml p-Aminobenzoesäure.

4.9. Enzymatische Synthese von Substanz A

4.9.1. Züchtungsbedingungen für A. aerogenes 62-1 AC

Die Mutante 62-1 AC wurde wie oben beschrieben in Medium G angezüchtet, abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und in Medium H suspendiert. Nach Inkubation (2 - 3

Stunden) unter Schütteln bei 30° C wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Salzlösung gewaschen und bei - 20° C eingefroren.

4.9.2. Gewinnung von Zellextrakt

Das Aufschließen der eingefrorenen Zellen erfolgte durch Zerreiben mit Aluminiumoxidpulver (Alcoa 305) bei 0 - 4° C. Der Zellbrei wurde mit kaltem 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8 aufgenommen und bei 20 000 g zentrifugiert. Der klare Ueberstand wurde zur Ausfällung von Nucleinsäuren mit einer 10 %igen Lösung von Dehydrostreptomycinsulfat (20 ml/100 ml Rohextrakt) versetzt. Der Niederschlag wurde bei 20 000 g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ueberstand einer Ammoniumsulfatfraktionierung (0 - 30 %, 30 % - 50 %, 50 % - 70 % Sättigung) unterworfen. Die einzelnen Fällungen wurden mit kaltem 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8 wieder aufgenommen und die Proteinlösungen im enzymatischen Test untersucht.

4.9.3. Enzymansätze

Die Enzymansätze hatten folgende Zusammensetzung: 2 ml Proteinlösung (19 mg Protein/ml) wurden mit Chorismsäure (0,113 mg/ml), L-Glutamin (2,92 mg/ml) und $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1,01 mg/ml) bei 37° C 30 Min. inkubiert. Nach Zugabe von weiterem L-Glutamin (2,92 mg/ml) wurden noch einmal 30 Min. bei 37° C inkubiert. Das Gesamtvolumen eines Enzymansatzes betrug 3 ml. Die Nullwertbestimmung wurde nach 2 Methoden durchgeführt: a) Der oben beschriebene Enzymansatz wurde sofort nach Vereinigung aller Komponenten 5 Min. im siedenden Wasserbad gekocht. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurde die Lösung biologisch ausgetestet. b) Der oben beschriebene Enzymansatz wurde ohne Chorismsäure 1 Stunde bei 37° C inkubiert, anschließend 5 Min. im siedenden Wasserbad gekocht und

das denaturierte Protein abzentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung biologisch ausgetestet.

4.9.4. Aufarbeitung der Enzymansätze

Nach Inkubation wurden 300 ml Enzymansätze mit kaltem Aceton (15 ml/10 ml Lösung) versetzt und das denaturierte Protein abzentrifugiert. Die klare Lösung wurde im Vakuum bei 25° C bis auf 2 - 3 ml eingeengt und auf eine Säule aus Sephadex G-25 (5 x 40 cm, 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8) gegeben. Eluiert wurde mit 0,05 M Tris-Puffer p_H = 8, und die Fraktionen wurden biologisch ausgetestet. Zwischen 640 ml und 780 ml Eluat erschien Substanz A. Diese Fraktionen wurden eingeengt und wie unter 4.8.6. beschrieben an Dowex 50 Wx8 (NH_4^+-Form) und an AE-Cellulose (OH^--Form) von Puffer befreit. Anschließend wurde die Lösung mit Ammoniumcitratpuffer auf p_H = 3,5 gebracht und an einer Säule aus SE-Sephadex C-25 (2,5 x 15 cm, NH_4^+-Form, im Gleichgewicht mit Ammoniumcitratpuffer p_H = 3,5) chromatographiert. Die Säule wurde mit demselben Puffer eluiert, und 5 ml-Fraktionen wurden aufgefangen. Die optische Dichte des Eluats wurde mit dem Uvicord I (LKB) fortlaufend registriert. Nach 120 ml Eluat erschien ein kleiner Peak, der im biologischen Test sowohl das Wachstum von E. coli K 5151 als auch das Wachstum von C. guilliermondii C 109 fördert.

5. Zusammenfassung

Auf der Suche nach einem Zwischenprodukt im Biosyntheseweg von p-Aminobenzoesäure wurden p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von Escherichia coli und Candida guilliermondii untersucht. Zwei Mutanten akkumulieren eine Substanz A, die das Wachstum anderer Mutanten fördert. Eingehende Versuche zeigten, daß die abgegebenen Substanzmengen für die Isolierung und Charakterisierung der Substanz A nicht ausreichend waren.

Aus diesem Grunde wurde versucht, eine Mutante zu isolieren, die größere Mengen von Substanz A produziert. Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war die polyauxotrophe Mutante 62-1 von Aerobacter aerogenes, die auf Grund ihrer genetischen Defekte große Mengen an Chorismsäure akkumuliert. Da Chorismsäure ein Vorprodukt in der Biosynthese von p-Aminobenzoesäure ist, konnte man erwarten, daß eine Kanalisierung dieser Substanz in Richtung p-Aminobenzoesäure erfolgt. Die biologische Austestung der Kulturflüssigkeit von Mutante 62-1 zeigte, daß tatsächlich mehr p-Aminobenzoesäure akkumuliert wurde als vom E. coli-Wildstamm. Nach Behandlung von A. aerogenes 62-1 mit dem Mutagen 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin wurde eine p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutante, 62-1 AC, isoliert, die 5o mal mehr fütterungswirksame Substanz A produziert als die p-Aminobenzoesäure$^-$-Mutanten von E. coli und C. guilliermondii.

Vorversuche zeigten, daß Substanz A in saurem Milieu unter Bildung von p-Aminobenzoesäure zerfällt. Aus diesem Grunde mußte die chromatographische Aufarbeitung der Akkumulatlösung im neutralen bis alkalischen Milieu erfolgen. Ein Reinigungsschritt an einem sauren Ionenaustauscher konnte jedoch nicht umgangen werden, wobei erhebliche Substanzverluste

auftraten. Nach mehreren Reinigungsschritten wurden ca. 0,5 mg Substanz A aus 300 l Medium gewonnen.

Substanz A hat bei p_H = 7 ein UV-Maximum bei 271 nm. Im sauren Milieu tritt eine bathochrome Verschiebung nach 290 nm auf, die bei sofortiger Zugabe von Natronlauge reversibel ist. Bei p_H = 1 wird Substanz A innerhalb von 2 - 3 Stunden in p-Aminobenzoesäure umgewandelt. Dabei treten keine weiteren UV-aktiven Zerfallsprodukte auf. Das CD-Spektrum weist zwei negative Cotton-Effekte auf.

Mit Enzymextrakten aus A. aerogenes 62-1 AC wird aus Chorismsäure und L-Glutamin Substanz A synthetisiert.

Die Umwandlung der Substanz A in p-Aminobenzoesäure in saurem Milieu und die Enzymversuche zeigen, daß Substanz A ein stickstoffhaltiges Vorprodukt in der Biosynthese von p-Aminobenzoesäure ist. Für Substanz A wird eine Struktur vorgeschlagen und ihre Bildung aus Chorismsäure und L-Glutamin diskutiert.

6. Literaturangaben

1 G. Fischer, Ann. Chem. 127, 137 (1863).
2 S. Ansbacher, Science (Washington) 93, 164 (1941).
3 D.D. Woods, Brit. J. exp. Pathol. 21, 74 (1940).
4 S.D. Rubbo u. J.M. Gillespie, Nature (London) 146, 838 (1940).
5 R. Kuhn u. K. Schwarz, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1617 (1941).
6 K.C. Blanchard, J. biol. Chem. 140, 1919 (1941).
7 P. Fildes, Lancet 238, 955 (1940).
8 S. Ratner, M. Blanchard, A.F. Coburn u. D.E. Green, J. biol. Chem. 155, 689 (1944).
9 S. Ratner, M. Blanchard u. D.E. Green, J. biol. Chem. 164, 691 (1946).
10 D.P. Richey u. G.M. Brown, J. biol. Chem. 244, 1582 (1969).
11 B.D. Davis, J.biol. Chem. 191, 315 (1951).
12 E.L. Tatum, in Plant Growth Substances, ed. F.S. Koog (Madison: University of Wisconsin Press, 1951).
13 B.D. Davis u. E.S. Mingioli, J. Bacteriol. 66, 129 (1953).
14 P.R. Srinivasan, J. Am. chem. Soc. 81, 1772 (1959).
15 B. Weiss u. P.R. Srinivasan, Proc. nat. Acad. Sci. 45, 1491 (1959).
16 B. Levenberg, J. Melnick u. J.M. Buchanan, J. biol. Chem. 225, 163 (1957).
17 F. Lingens, W. Lück u. G. Müller, Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. 343, 282 (1966).
18 P.R. Srinivasan u. B. Weiss, Biochim. Biophys. Acta 51, 597 (1961).
19 M.I. Gibson, F. Gibson, C.H. Doy u. P.N. Morgan, Nature (London) 195, 1173 (1962).
20 M.I. Gibson u. F. Gibson, Biochim. Biophys. Acta 65, 160 (1962).

21 M.I. Gibson u. F. Gibson, Biochem. J. 90, 248 (1964).
22 F. Gibson, Biochem. J. 90, 256 (1964).
23 F. Gibson u. L.M. Jackmann, Nature (London) 198, 388 (1963).
24 J.M. Edwards u. L.M. Jackmann, Australian J. Chem. 18, 1227 (1965).
25 F. Gibson, M. Gibson u. G.B. Cox, Biochim. Biophys. Acta 82, 637 (1964).
26 J.A. De Moss, J. biol. Chem. 240, 1231 (1965).
27 F. Lingens, B. Spröβler u. W. Goebel, Biochim. Biophys. Acta 121, 164 (1966).
28 C.H. Doy, Biochim. Biophys. Acta 118, 173 (1966).
29 T.I. Baker u. I.P. Crawford, J. biol. Chem. 241, 5577 (1966).
30 B. Drake, Genetics 41, 640 (1956).
31 M. Huang u. J. Pittard, J. Bacteriol. 93, 1938 (1967).
32 S. Hendler u. P.R. Srinivasan, Biochim. Biophys. Acta 141, 656 (1967).
33 O. Oltmanns, A. Bacher u. F. Lingens, Z. Naturforsch. 23 b, 1556 (1968).
34 F. Lingens u. O. Oltmanns, Z. Naturforsch. 19 b, 1058 (1964).
35 A. Bacher u. F. Lingens, Angew. Chem. 81, 393 (1969).
36 F. Gibson, Biochem. Prep. 12, 94 (1968).
37 I.G. Young, F. Gibson u. C.G. MacDonald, Biochim. Biophys. Acta 192, 62 (1969).
38 M. Engelhardt, H. Plieninger u. P. Schreiber, Chem. Ber. 97, 1713 (1964).
39 M. Katagiri u. R. Sato, Science (Washington) 118, 250 (1953).
40 B.D. Davis, Science (Washington) 118, 251 (1953).
41 U. Weiss, Ch. Gilvarg, E.S. Mingioli u. B.D. Davis, Science (Washington) 119, 774 (1954).
42 I.G. Young, T. Batterham u. F. Gibson, Biochim. Biophys. Acta 165, 567 (1968).

43 I.G. Young, T. Batterham u. F. Gibson, Biochim. Biophys. Acta 177, 389 (1969).

44 J.R.D. Mc Cormick, J. Reichenthal, U. Hirsch u. N.O. Sjolander, J. Amer. chem. Soc. 83, 4104 (1961), 84, 3711 (1962).

45 H. Zalkin u. D. Kling, Biochemistry 7, 3566 (1968).

46 B. Levenberg u. J.M. Buchanan, J. biol. Chem. 244, 1019 (1957)

47 B. Abrams u. M. Bentley, Arch. Biochem. Biophys. 79, 91 (1959).

Lebenslauf

Am 21. März 1942 wurde ich als Sohn des kaufm. Angestellten Heinrich Altendorf und seiner Ehefrau Helene, geb. Fabian, in Rimbach/Odw. geboren. Von 1949 - 1953 besuchte ich die Volksschule, anschließend das Gymnasium in Rimbach, wo ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Hochschule in Darmstadt. Die mündliche Diplomprüfung legte ich im November 1966 ab. Anschließend fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lingens an der Universität Tübingen eine Diplomarbeit "Abbau des Chloramphenicols durch Enzyme eines resistenten Bodenbakteriums" an. Im Herbst 1967 begann ich unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lingens mit der Anfertigung einer Doktorarbeit "Ueber die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure in Mikroorganismen."

Am 26. Januar 1968 heiratete ich Fräulein Christel Kiehnle.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

Bähr, Buttlar, Cramer, Elias, Habermehl, Hafner, Hanack, Kahle, Kauffmann, Kohlschütter, Kreher, Laugwitz, Lieser, Lichtenthaler, Lingens, Riekert, Schlögl, Schoenemann, Schöpf, Schramm, Seyffert, Thesing, Waidelich, Weil, Weiß, Witte, Wölfel, Zähner.

BAMBERGER FOTODRUCK - RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG-Markusplatz 22 - Telefon : 0951/62794